

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

АНОТАЦІЯ

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

з напрямку підготовки 6.051401 Біотехнологія

**на тему: «Технологія виробництва біоспорину у флаконах. Дільниця
біосинтезу»**

Виконав:

студент IV курсу, групи БТ-62

Щербина Валентин Юрійович _____

Керівник:

Доцент каф. промислової біотехнології, к.б.н., с.н.с

Яловенко Олена Ігорівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для
проведення технологічного процесу:

Ст. викл. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

Асистент каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.

Зубченко Людмила Сергіївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент _____

Київ – 2020 року

У сучасній медичній практиці існує інтерес до якісних антибіотикорезистентних пробіотичних препаратів, які здатні не тільки відновлювати мікрофлору шлунково-кишкового тракту, але й мають імуномодулювальні властивості. Такий інтерес обумовлений ростом масштабів застосування антибіотичної терапії, а внаслідок цього необхідності нормалізувати мікрофлору кишківника для нормального функціонування організму під час дисбіозів спричинених антибіотиками. Біоспорин за своєю природою являється препаратом на основі спороутворюючих бактерій транзиторної мікрофлори, що мають стійкість до зовнішніх умов середовища кишківника та безпечно самоізолюються з організму після проходження їх життєвого циклу.

Не дивлячись на природню стійкість спор *Bacillus*, що є основою Біоспорину, штами, які використовують сьогодні у складі препарату, все ще вразливі до дії багатьох антибіотиків. Саме тому в проекті приділена увага розробці ефективної технології виробництва на основі культивування антибіотикостійких штамів, створених на основі модифікації штучним доббором бактерій, що входять до оригінального складу препарату.

Метою проекту є розробка технології виробництва пробіотичного препарату «Біоспорин» з покращенням стадії виробничого біосинтезу.

Завдання, які були поставлені для досягнення даної мети:

- Обрати продуцент та вивчити його морфолого-фізіологічні та культуральні особливості.
- Запропонувати методи отримання промислових штамів.
- Розробити оптимальну технологію виробництва та підібрати відповідне обладнання.
- Розробити технологічну та апаратурну схему виробництва препарату для культивування продуцентів глибинним способом з отриманням ліофілізованого продукту, описати контроль виробництва.

— Обґрунтувати вибір ферментерів для проведення культивування продуцентів. Провести технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки ферментера.

— Провести аналіз небезпечних та шкідливих факторів виробництва пробіотику, навести основні вимоги з техніки безпеки та охорони праці.

В якості штамів-продуцентів було обрано штами *Bacillus subtilis* 3/Re та *Bacillus licheniformis* 31/Re, які за морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками, є однаковими з *Bacillus subtilis* 3 та *Bacillus licheniformis* 31. Вони являють собою грампозитивні прямі палички із закругленими або обрубленими кінцями. *Bacillus subtilis* 3/Re – це облигатний аероб, що найкраще росте за температури 37 °C та pH 7±0,5; а *Bacillus licheniformis* 31/Re – це факультативний аероб, термофіл, що найкраще росте за температури 50 °C та pH 7±0,5. Саме *B. licheniformis* 31/Re забезпечує підвищену пристосованість препарату до нестандартних умов.

Біоспорин проявляє високу антагоністичну активність по відношенню до патогенних і умовно-патогенних мікробів і не впливає на нормальну мікрофлору кишківника. Антагоністична дія бацил здійснюється за рахунок продукції різних за своєю природою біологічно активних речовин: поліпептидних антибіотиків (більше 200 антибіотикоподібних речовин, у багатьох випадках з синергетичним ефектом), лізоциму, літичних ферментів, які володіють як бактерицидним, так і бактериостатичним ефектом. Крім того, *Bacillus subtilis* і *Bacillus licheniformis* в процесі своєї життєдіяльності потенціюють вироблення в епітелії слизової шлунково-кишкового тракту антимікробних пептидів. Дипіколінова кислота у складі препаратів проявляє антагоністичну активність по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Candida*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella*, *Campylobacter Coli* і *Jeuni*, *Citrobacter*, *Streptococcus pneumonia*.

Цей фактор (дипіколінова кислота) є унікальним для бактерій роду *Bacillus*, бо він присутній тільки в їх ендоспорах. Дипіколінова кислота у спорах знаходиться у вигляді хелатного комплексу з двома іонами кальцію.

Підвищити її синтез можливо тільки за рахунок спороутворення, тобто створення екстремальних для клітини умов, наприклад при дії 5% перекисом водню. Але такі умови не є економічно вигідними через значне зниження приросту біомаси в процесі індукції. Тому для індукції синтезу цього фактору антагоністичної активності доцільніше використовувати методи генної та клітинної інженерії.

Технологічний процес розпочинається з допоміжних робіт, які включають санітарну підготовку виробництва, підготовку вентиляційного та аераційного повітря, робочих розчинів, сахарозо-желатинового захисного середовища для сушіння, підготовку поживних середовищ. Технологія отримання біотерапевтичного препарату Біоспорин складається з таких принципових стадій: підготовка посівного матеріалу, виробниче культивування, заморожування та ліофілізація біомаси.

Термостабільні та термолабільні компоненти середовищ готують окремо, а потім змішують разом, отримуючи поживне середовище для підготовки посівного матеріалу та культивування. До складу поживного середовища входять: кислотний гідролізат казеїну, кукурудзяний екстракт, глюкоза, а також сольові компоненти.

Перед введенням інокулятів у виробничі ферментери необхідно при підготовці посівного матеріалу термоактивувати посівні матеріали температурою 70 °C протягом 30 хв, оскільки це підвищить продуктивність утворення біомаси при культивуванні.

Виробниче культивування бактерій *Bacillus subtilis* 3/Re (в дужках наведені параметри культивування *Bacillus licheniformis* 31/Re) здійснюють у ферментері об'ємом 0,25 (0,1) м³ при температурі 37±1 °C, підтримують рН 7±0,5, постійно подають аеруюче стерильне повітря 0,7 (0,4) м³ повітря / м³ поживного середовища, а також відбувається постійне перемішування за частоти 325 (500) об/хв. Після культивування культуральні рідини охолоджують до 8 °C.

На наступному етапі технологічного процесу відбувається змішування культуральних рідин між собою та із захисним середовищем для сушіння, а також стабілізація культуральної рідини, де контролюється рН (7,0-7,4) та мікробіологічна чистота рідини, а саме – відсутність в ній сторонньої мікрофлори внаслідок контамінації.

Після цього приготований напівпродукт розливають по флаконах по 4 мл в кожний та відправляють на заморозку в установки глибокого заморожування при -40°C . Після розливу та після заморожування, для уникнення контамінації при транспортуванні, флакони накривають стерильним марлевым простирадлом і медичною клейонкою, з подальшою передачею до сушарки.

Після заморожування препарат ліофільно сушать у сублімаційних сушильних установках ТГ-50. Рідина під дією заморожування і глибокого вакууму, а згодом і температури сублімується у вигляді водяної пари вивітрюється з флаконів. Водяна пара потрапляє в льодоконденсатор, на пластинах якого при температурі -60°C йде десублімація і випадає осад у вигляді інею. Температуру підвищують по 3°C на годину і до 30 годин сушіння вона досягає $+40^{\circ}\text{C}$. При $+18^{\circ}\text{C}$ препарат витримують 18 годин. Весь процес триває протягом 48 годин при $p=10$ Па до кінцевої вологості 3-4 %. Після закінчення процесу сушіння відкривають камеру та вивантажують продукцію.

Флакони із сухою мікробною масою закупорюють під вакуумом або в потоці інертного газу. З дотриманням правил асептики флакони закупорюють підготованими пластиковими кришками. Допустима похибка при фасуванні не повинна перевищувати $\pm 3\%$. На флакони на автоматичній лінії наноситься етикетка з паперу етикетного або паперу письмового, виготовлена поліграфічним способом друку або тисненням із зазначенням необхідної для зберігання, подальшої реалізації та транспортування інформації. Флакони з препаратом пакують у вторинну тару - картонні коробки з перетинками згідно ГОСТ 12301-2006, по 10 флаконів у партії. На коробку наносять або

вкладають всередину друковану етикетку з інформацією щодо продукту. Коробки закривають та відправляють на склад для подальшого зберігання або реалізації.

В процесі виробництва утворюється ряд відходів, які проходять стадії знезараження. Проводять знезараження вентиляційного та стерильного повітря, конденсату, некондиційного посівного матеріалу та культуральної рідини, промислових стоків, партій бракованого препарату тощо.

Було проведено аналіз конструкцій ферментерів, та обрано і розраховано ферментер, що представляє собою вертикальний апарат з еліптичним днищем та еліптичною зйомною кришкою, із нержавіючої сталі, з турбінним перемішуючим пристроєм відкритого типу та барботером, що забезпечують необхідне для культивування перемішування та аерацію. Об'єм – 0,25 м³, коефіцієнт заповнення – 0,6, робочий об'єм – 0,15 м³, внутрішній діаметр – 700 мм, діаметр перемішуючого пристрою 180 мм.

За результатами роботи сформульовано такі висновки:

1. У проєкті для виробництва двоштамового пробіотичного препарату Біоспорин обрано продуценти *Bacillus subtilis* 3/Re, *Bacillus licheniformis* 31/Re із підвищеною антибіотикорезистентністю.

2. Було визначено, що, незважаючи на близькі морфологічні, фізіолого-біохімічні ознаки до штамів-продуцентів оригінального складу препарату Біоспорин (*Bacillus subtilis* 3, *Bacillus licheniformis* 31), *Bacillus subtilis* 3/Re та *Bacillus licheniformis* 31/ Re, у пропорції на одну дозу препарату $10 \cdot 10^9$ та $1,6 \cdot 10^9$ КУО/мл відповідно, проявляють кращу антагоністичну активність до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори кишківника.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуцентів *Bacillus subtilis* 3/Re, *Bacillus licheniformis* 31/Re обрано склад поживного середовища для виробничого культивування на основі кислотного гідролізату казеїну та кукурудзяного екстракту, а також визначені оптимальні параметри для культивування (для *B.licheniformis* 31/Re в дужках): температура $37 \pm 1^\circ\text{C}$,

pH=7,0±0,5, перемішування при 325 (500) об/хв, тривалість 26-33 год, аерація 0,7 (0,4) $V_{\text{пов}}/V_{\text{ПС}}$.

4. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів антибіотиків та запропоновано схему отримання продуценту шляхом штучного добору за дії поступового підвищення концентрації антибіотиків при послідовних пересівах.

5. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для його отримання в процесі культивування обрано і розраховано конструкцію виробничого ферментера для культивування *B.subtilis 3/Re* об'ємом 0,25 м³, що дозволяє отримати культуральну рідину належної якості, зокрема необхідної концентрації КУО (концентрація живих клітин або спор $10 \cdot 10^9$ КУО/мл) .

6. Запропоновано склад поживного середовища на основі кислотного гідролізату казеїну та кукурудзяного екстракту, що обумовлює значний ріст культури продуцента, а також підвищує антагоністичну активність даного препарату.

7. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва пробіотичного препарату Біоспорин в якості харчової добавки у флаконах.

NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF UKRAINE
«Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute»
Faculty of Biotechnology and Biotechnics
Department of Industrial Biotechnology

ANNOTATION

Diploma project

for a bachelor's degree

in the direction of learning 6.051401 Біотехнологія

**on the topic: « Technology of biosporin production in vials. Area of the
product biosynthesis»**

Executed:

IV year student, group BT-62

Shcherbyna Valentyn Yuriyovych _____

Diploma supervisor:

Assistant professor, c.b.s, senior researcher

Yalovenko Olena Ihorivna _____

Consultant from Section 5. Calculation of equipment
for the technological process:

Sen.lect. Dep.of biotechnology and bioengineering, c.t.s.

Fesenko Sergiy Viktorovich _____

Reviewer:

Assist. lect. Dep. of environmental biotechnology and bioenergy, c.t.s.

Zubchenko Liudmyla Serhiivna _____

I certify that in this diploma project there
are no borrowings from the works of other
authors without appropriate references.

Student _____

Kyiv – 2020

In modern medical practice, there is an interest in high-quality antibiotic-resistant probiotics, which can not only restore the microflora of the gastrointestinal tract but also have immunomodulatory properties. This interest is due to the growing scale of antibiotic therapy, and consequently the need to normalize the intestinal microflora for the normal functioning of the body during dysbiosis caused by antibiotics. Biosporin by its nature is a drug based on spore-forming bacteria of the transient microflora, which are resistant to external environmental conditions of the intestine and safely self-isolate from the body after their life cycle.

Despite the natural resistance of *Bacillus* spores, which is the basis of Biosporin, the strains used today in the drug are still vulnerable to many antibiotics. That is why the project pays attention to the development of effective technology for the production of the drug "Biosporin" based on the cultivation of antibiotic-resistant strains created on the basis of modification by artificial selection of bacteria that are part of the original composition of the drug.

The aim of the project is to develop a technology for the production of probiotic drug "Biosporin" with the improvement of the area of industrial biosynthesis.

Tasks that were set to achieve this goal:

- Choose a producer and study its morphological, physiological and cultural features.
- Suggest methods of obtaining industrial strains.
- Develop the optimal technology of drug production and select the appropriate equipment.
- Justify the choice of fermenters for cultivation of producers. Carry out technological, constructive and thermal calculations of the fermenter.
- To analyze the dangerous and harmful factors of probiotic production, to give the basic requirements for safety and labor protection.
- *Bacillus subtilis* 3/Re and *Bacillus licheniformis* 31/Re strains were selected as producer strains, which are morphologically, culturally and

physiologically and biochemically identical to *Bacillus subtilis* 3 and *Bacillus licheniformis* 31. They are gram-positive straight rods from or cut ends. *Bacillus subtilis* 3/Re is an obligate aerobic that grows best at 37 °C and pH 7 ± 0.5; and *Bacillus licheniformis* 31/Re is an optional aerobic, thermophile, that grows best at 50 °C and pH 7 ± 0.5. It is *B. licheniformis* 31 / Re that provides increased adaptability of the drug to non-standard conditions.

Biosporin shows high antagonistic activity against pathogenic and conditionally pathogenic microflora and does not affect the normal intestinal microflora. The antagonistic action of bacilli is due to the production of biologically active substances of different nature: polypeptide antibiotics (more than 200 antibiotic-like substances, in many cases with a synergistic effect), lysozyme, lytic enzymes, which have both bactericidal and bacteriostatic effects. In addition, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in the course of their vital activity potentiate the production in the epithelium of the mucous membrane of the gastrointestinal tract of antimicrobial peptides. Dipicolinic acid in the preparations shows antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, *Candida*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella*, *Campylobacter Coli* and *Jeuni*, *Citrobacter*, *Streptococcus pneumonia*.

This factor (dipicolinic acid) is unique to bacteria of the genus *Bacillus* because it is present only in their endospores. Dipicolinic acid in spores is in the form of a chelate complex with two calcium ions. To increase its synthesis is possible only through spore formation, i.e. the creation of extreme conditions for the cell, for example under the action of 5% hydrogen peroxide. But such conditions are not economically advantageous due to a significant reduction in biomass growth during induction. Therefore, to induce the synthesis of this factor of antagonistic activity, it is more appropriate to use genetic and cellular engineering methods.

The technological process begins with ancillary works, which include sanitary preparation of production, preparation of ventilation and aeration air, working solutions, sucrose-gelatin protective environment for drying, preparation

of nutrient media. The technology of obtaining biotherapeutic drug Biosporin consists of the following basic stages: preparation of seed material, production cultivation, freezing and lyophilization of biomass.

Thermostable and thermolabile components of the media are prepared separately and then mixed together to obtain a nutrient medium for seed preparation and cultivation. The nutrient medium includes: acid hydrolyzate of casein, corn extract, glucose, and salt components.

Before the injection of inocula into the production fermenters, it is necessary to thermoactivate the seed material at a temperature of 70 °C for 30 min during the preparation of the seed, as this will increase the productivity of biomass formation during cultivation.

Production cultivation of *Bacillus subtilis* 3/Re bacteria (in parentheses are the parameters of cultivation of *Bacillus licheniformis* 31/Re) is carried out in a fermenter with a volume of 0.25 (0.1) m³ at a temperature of 37 ± 1 °C, maintain a pH of 7 ± 0.5 , constantly supplying aerated sterile air 0.7 (0.4) m³ of air / m³ of nutrient medium, and there is a constant stirring at a frequency of 325 (500) rpm. After cultivation, the culture fluids are cooled to 8 °C.

At the next stage of the technological process there is a mixing of culture fluids with each other and with a protective environment for drying, as well as stabilization of the culture fluid, which controls the pH (7.0-7.4) and microbiological purity of the liquid, namely the absence of exterior microflora due to contamination.

After that, the prepared intermediate is poured into vials of 4 ml each and sent for freezing in a deep freezer at -40 °C. After bottling and after freezing, to avoid contamination during transportation, the vials are covered with a sterile gauze sheet and medical oilcloth, followed by transfer to the dryer.

After freezing, the drug is freeze-dried in freeze-drying TG-50. The liquid under the action of freezing and deep vacuum, and subsequently sublimated in the form of water vapor is evaporated from the vials. Water vapor enters the ice condenser, on the plates of which at a temperature of -60 °C is desublimation and

precipitates in the form of frost. The temperature is raised by 3 ° C per hour and up to 30 hours of drying it reaches + 40 °C. At + 18 °C the drug is incubated for 18 hours. The whole process lasts for 48 hours at $p = 10$ Pa to a final humidity of 3-4%. At the end of the drying process, the chamber is opened and the products are unloaded.

Vials with dry microbial mass are sealed under vacuum or in a stream of inert gas. In accordance with the rules of asepsis, the vials are closed with prepared plastic caps. The permissible error during packing should not exceed $\pm 3\%$. The vials on the automatic line are labeled with label paper or writing paper, made by printing or embossing, indicating the information necessary for storage, subsequent sale and transportation. Vials with the drug are packed in secondary packaging - cardboard boxes with membranes according to GOST 12301-2006, 10 vials per batch. A printed label with product information is applied to or placed inside the box. The boxes are closed and sent to the warehouse for further storage or sale.

In the process of production, a number of wastes are generated, which undergo stages of disinfection. Disinfection of ventilation and sterile air, condensate, substandard inoculum and culture fluid, industrial effluents, batches of defective drug, etc. is carried out.

The constructions of the fermenters were analyzed, and a fermenter was selected and calculated, which is a vertical apparatus with an elliptical bottom and an elliptical removable lid, made of stainless steel, with an open turbine mixing device and a bubbler, providing the necessary mixing and aeration for cultivation. Volume - 0.25 m³, filling coefficient - 0.6, working volume - 0.15 m³, inner diameter - 700 mm, diameter of the mixing device 180 mm.

Based on the results of the work, the following conclusions are formulated:

1. Producers of *Bacillus subtilis* 3/Re, *Bacillus licheniformis* 31/Re with increased antibiotic resistance were selected in the project for production of two-strain probiotic preparation Biosporin.

2. It was determined that, despite the close morphological, physiological and biochemical characteristics to the producer strains of the original composition of

the drug Biosporin (*Bacillus subtilis* 3, *Bacillus licheniformis* 31), *Bacillus subtilis* 3/Re and *Bacillus licheniformis* 31/Re, in proportion to one dose of the drug $10 \cdot 10^9$ and $1.6 \cdot 10^9$ CFU / ml, respectively, show better antagonistic activity to pathogenic and conditionally pathogenic intestinal microflora.

3. Taking into account the physiological and biochemical characteristics of producers *Bacillus subtilis* 3/Re, *Bacillus licheniformis* 31/Re the composition of the nutrient medium for production cultivation based on acid hydrolyzate of casein and corn extract was selected, and the optimal parameters for cultivation were determined (for *B.licheniformis* 31/Re in parentheses): temperature 37 ± 1 °C, pH = 7.0 ± 0.5 , stirring at 325 (500) rpm, duration 26-33 h, aeration 0.7 (0.4) $V_{\text{air}} / V_{\text{media}}$.

4. The methods of selection of industrial strains-producers of antibiotics are analyzed and the scheme of obtaining the producer by artificial selection under the action of gradual increase of the concentration of antibiotics during successive reseedling is proposed.

5. In accordance with the defined physicochemical and biological characteristics of the product for its production in the cultivation process, the design of the production fermenter for cultivation of *B.subtilis* 3/Re with a volume of 0.25 m^3 is selected and calculated, which allows to obtain culture fluid of proper quality, in particular the required CFU concentrations (concentration of living cells or spores $10 \cdot 10^9$ CFU / ml).

6. The composition of the nutrient medium based on acid hydrolyzate of casein and corn extract is proposed, which causes a significant growth of the producer's culture, as well as increases the antagonistic activity of this drug.

7. In accordance with the requirements for the finished form and quality of the product, developed technological and hardware schemes for the production of probiotic drug Biosporin as a food additive in vials.

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва біоспорину у флаконах. Дільниця
біосинтезу»**

Виконав:

студент IV курсу, групи БТ-62

Щербина Валентин Юрійович _____

Керівник:

Доцент каф. промислової біотехнології, к.б.н., с.н.с

Яловенко Олена Ігорівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для
проведення технологічного процесу:

Ст. викл. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

Асистент каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.

Зубченко Людмила Сергіївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

[illegible]

				ДП 6221 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Щербина В.Ю.				1	1
Керівн.	Яловенко О.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Консульт.	Фесенко С.В.					
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва біоспорину у
флаконах. Дільниця біосинтезу»**

Київ – 2020 року

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Щербині Валентину Юрійовичу

1. Тема проєкту «Технологія виробництва біоспорину у флаконах. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту Яловенко Олена Ігорівна, к.б.н., доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с
2. Термін подання студентом проєкту _____
3. Вихідні дані до проєкту: штами-продуценти *B.subtilis* 3/Re, *B.licheniformis* 31/Re; середовище культивування на основі кислотного гідролізату казеїну та кукурудзяного екстракту; ферментери для промислового культивування – об'єм 0,25 та 0,1 м³; параметри культивування: $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, аерація, перемішування, $\tau = 26\text{-}33$ год; кінцевий продукт – ліофілізований порошок (пориста маса) у флаконах.
4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва пробіотичного препарату; розглянути основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; провести аналіз методів створення високопродуктивних

промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1.

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	01.04.20-14.04.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	01.04.20-14.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	01.04.20-14.04.20	
4.	Технологічна частина	14.04.20-22.04.20	
5.	Складання апаратурної схеми	14.04.20-22.04.20	
6.	Охорона праці	28.04.20-15.05.20	
7.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	28.04.20-15.05.20	
8.	Подання дипломного проєкту до екзаменаційної комісії	30.05.20-08.06.20	

Студент

Валентин ЩЕРБИНА

Керівник

Олена ЯЛОВЕНКО

РЕФЕРАТ

Дипломний проєкт: 120 с., 8 рис., 9 табл., 82 посилання.

Робота присвячена вдосконаленню процесів культивування, зокрема складу поживного середовища та використання покращених штамів, при виробництві пробіотичного препарату Біоспорин.

Запропоновано в якості штамів-продуцентів використовувати антибіотикорезистентні спороутворюючі бактерії *Bacillus subtilis* 3/Re та *Bacillus licheniformis* 31/Re, отримані в результаті селекції штучним доббором. Розглянуто морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки обраних продуцентів, їх пробіотичні властивості.

Розраховане та вибране обладнання для культивування бактерій *Bacillus subtilis* 3/Re. Наведено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки виробничого ферментера. У роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схеми виробництва.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: БІОСПОРИН, *BACILLUS SUBTILIS*, *BACILLUS LICHENIFORMIS*, СПОРОУТВОРЮЮЧІ БАКТЕРІЇ, ПРОБІОТИКИ, ВИРОБНИЧЕ КУЛЬТИВУВАННЯ, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІ ПРОБІОТИЧНІ ШТАМИ, АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ.

					ДП 6221. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Щердина В.Ю.				Д	5	120
Консульт.								
Керівник		Яловенко О.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

ABSTRACT

Diploma project: 120 pages, 8 figures, 9 tables, 82 references.

The work is devoted to the improvement of cultivation processes, in particular the composition of the nutrient medium and the use of improved strains, in the production of the probiotic drug Biosporin.

It is proposed to use antibiotic-resistant spore-forming bacteria *Bacillus subtilis* 3/Re and *Bacillus licheniformis* 31/Re, obtained by artificial selection, as producer-strains. Morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics of selected producers, their probiotic properties are considered.

Equipment for the cultivation of bacteria *Bacillus subtilis* 3/Re was calculated and selected. Technological, constructive and thermal calculations of the production fermenter are given. The technological and equipment schemes of production are substantiated and presented in the work.

KEYWORDS: BIOSPORIN, BACILLUS SUBTILIS, BACILLUS LICHENIFORMIS, SPORE-FORMING BACTERIA, PROBIOTICS, INDUSTRIAL CULTIVATION, CULTURE MEDIA, ANTIBIOTIC-RESISTANT PROBIOTIC STRAINS, ANTAGONISTIC ACTIVITY.

					ДП 6221. 00.000 ПЗ	Арк.
						6
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
1. РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
1.1.Основні промислові продуценти.....	12
1.2.Морфолого-цитологічні ознаки.....	13
1.3.Культуральні ознаки.....	15
1.4.Фізіолого-біохімічні ознаки.....	15
1.5.Серологічні ознаки та фактори патогенності.....	19
1.6.Поширення в природі та стійкість до зовнішніх факторів.....	19
2. РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	22
2.1.Характеристика кінцевого продукту.....	22
2.2.Схема хімічних перетворень.....	24
2.3.Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	27
2.4.Методи очистки цільового продукту.....	27
2.5.Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	28
3. РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	33
3.1.Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	33
3.1.1. Наявність генетичних карт продуцентів або типового представника групи.....	35
3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу...37	37
3.2.Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	42
3.2.1. Використання природного та штучного добору.....	44
3.2.2. Використання індукованого мутагенезу.....	44

					ДП 6221. 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розробив		Щердина В.Ю.				Д	7	120
Консульт.								
Керівник		Яловенко О.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

3.2.3. Використання методів генної та клітинної інженерії.....	46
3.3.Схема отримання продуцентів, що використовуються в роботі.....	48
4. РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	56
4.1.Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	56
4.2.Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються на виробництві.....	57
4.3.Опис технологічного процесу.....	60
4.4.Матеріальний баланс.....	79
4.5.Контроль виробництва.....	82
5. РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	91
5.1.Обґрунтування обраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	91
5.2.Технологічний, конструктивний, тепловий розрахунки.....	95
5.2.1. Технологічний розрахунок.....	96
5.2.2. Тепловий розрахунок.....	97
5.2.3. Розрахунок перемішуючого пристрою.....	102
5.2.4. Розрахунок барботеру.....	103
5.3.Вибір загальнозаводського обладнання.....	105
5.4.Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	106
ВИСНОВКИ.....	110
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	112

ВСТУП

У сучасному світі люди живуть у дуже швидкому ритмі, часто забуваючи про правильне харчування і догляд за своїм здоров'ям. Харчування нашвидкуруч може призвести до таких захворювань як дисбактеріоз та гострі кишкові інфекції, які з'являються внаслідок порушення природного балансу мікробіоти кишківника. Здорова мікрофлора кишківника відповідає за нормальний стан здоров'я та підтримку гомеостазу організму, а тому без неї неможливе нормальне функціонування організму. Мікробіота кишківника є одним із найважливіших факторів при використанні лікарських засобів, так як вона бере участь у біотрансформації, дезінтоксикація і підтримці іонного балансу [1]. Відповідно, без здорової мікрофлори неможливий нормальний процес лікування за необхідності.

Крім особистого темпу життя, погіршується також екологічна обстановка в Україні та світі. Збільшується кількість хімічних, фізичних та біологічних факторів, що призводять до розвитку хронічних захворювань верхніх дихальних шляхів, що є найбільш розповсюдженими та такими, що передаються найлегше. Вони мають тенденцію до ускладнення та до рецидивів, а тому є складними і дуже небезпечними. Для боротьби з цими хворобами, у медичній практиці, прийнято користуватись антибіотичною терапією, але антибіотики діють не тільки на патогенні мікроорганізми, а ще й на здорову мікрофлору і на печінку. Оскільки захворювання хронічні, то терапія, не говорячи про самолікування, зазвичай тривала та призводить до порушень у природньому бактеріальному балансі організму людини. Без прийняття певних профілактичних мір таке лікування може привести до пригнічення імунної системи організму або лікарської алергії. Такою мірою є прийом пробіотичних препаратів, які, за рахунок мікробного антагонізму та

					ДП 6221 00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Щербина В.Ю.			ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	9	120
Керівник		Яловенко О.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.								

підвищення фагоцитарної активності мікро- та макрофагів, збільшують ймовірність подолання хронічних інфекційних захворювань без застосування антибіотикотерапії [2]. Пробіотики – це препарати, які представляють собою комплекс корисних мікроорганізмів, що використовуються для відновлення бактеріального балансу при дисбактеріозі та інших захворюваннях, зв'язаних з порушенням бактеріального балансу [3].

Актуальність роботи заключається у тому, що в зв'язку з розвитком антибіотикорезистентності патогенної мікрофлори, на сьогоднішній день підвищена увага приділяється розробці профілактичних засобів зміцнення природньої резистентності макроорганізму до збудників різноманітних інфекцій. Одним із найкращих засобів підвищення природнього імунітету є пробіотичні препарати з високою антибіотикорезистентністю, створені на основі представників транзитornoї мікрофлори організму хазяїна, таких як представники роду *Bacillus*.

Біоспорин – це пробіотик, що містить у собі два штами мікроорганізмів транзитornoї мікрофлори: *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis*, розробка технології виробництва якого розглядається в проєкті. Було показано, що цей препарат є безпечним для використання людиною, так як мікроорганізми, що вносяться з цим препаратом самоелімінуються після проходження життєвого циклу та здійснення позитивного впливу на мікрофлору організму [4].

Метою роботи є розробка технології виробництва пробіотичного препарату «Біоспорин» з покращенням стадії виробничого біосинтезу.

Для виконання цієї мети поставлені наступні завдання:

1. Обрати продуцент та вивчити його морфолого-фізіологічні та культуральні особливості.
2. Запропонувати методи отримання промислових штамів.
3. Розробити оптимальну технологію виробництва та підібрати відповідне обладнання.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

4. Розробити технологічну та апаратурну схему виробництва препарату для культивування продуцентів глибинним способом з отриманням ліофілізованого продукту, описати контроль виробництва.

5. Обґрунтувати вибір ферментерів для проведення біосинтезу продуценту. Провести технологічний, тепловий та конструктивний розрахунки ферментера.

6. Провести аналіз небезпечних та шкідливих факторів виробництва пробіотику, навести основні вимоги з техніки безпеки та охорони праці.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						11
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

Дослідники в області мікробіології привернули увагу до бактерій роду *Bacillus* як до перспективних захисників внутрішньої мікрофлори організму. Цей рід бактерій є надзвичайно стійким до несприятливих умов зовнішнього середовища, зазвичай штами бактерій цього роду мають високу ферментативну та антагоністичну активність до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Самі вони є продуцентами біологічно активних речовин, але при цьому не викликають розвитку патологій у людей. Саме ця унікальність робить їх незамінними при виробництві лікувально-профілактичних засобів, зокрема Біоспорину. При пероральному введенні спори бацил проростають і починається розмноження вегетативних бактеріальних клітин. У результаті цього в верхніх відділах шлунково-кишкового тракту утворюються зони антагоністичного інгібування патогенних мікроорганізмів і знижується їх кількість, аж до повного зникнення. Зазначені бактерії істотно підвищують неспецифічну резистентність організму, а деякі штами індукують синтез ендогенного інтерферону. Крім того, бактерії роду *Bacillus* діють в кишечнику як біокаталізатори, продукуючи ферменти, вітаміни і амінокислоти. Найбільш повно і всебічно вивчені види *B. subtilis* і *B. licheniformis*, які і є продуцентами препарату Біоспорин [5].

За сучасною систематикою Кавальє-Сміта основні продуценти належать до [6]:

за доменом – Прокаріоти,

за царством – Бактерії,

					ДП 6221 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Щердина В.Ю.			РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	12
						Аркушів	
						120	
Керівник		Яловенко О.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.						ФБТ	

за типом – *Firmicutes*,

за класом - *Bacilli*,

за порядком - *Bacillales*,

за родиною - *Bacillaceae*,

за родом - *Bacillus*,

за видом - *Bacillus subtilis* (штам 3) та *Bacillus licheniformis* (штам 31).

У визначнику Берджі дані продуценти відносяться до 18 групи «Грампозитивні палички та коки, що утворюють ендоспори» [7].

Згідно з першим патентом про винайдення препарату Біоспорин – це змішана у відповідному відношенні висушена біомаса штамів бактерій *Bacillus subtilis* 3 та *Bacillus licheniformis* 31. Але, у даному проекті, в якості продуцентів, буде розглянуто нові штами, які за морфолого-цитологічними, фізіологічними та культуральними ознаками, ідентичні з вихідними штамами, проте являються більш стійкими до впливу різних родів антибіотиків. У цьому підрозділі і в інших, буде описано штами *Bacillus subtilis* 3 та *Bacillus licheniformis* 31, але продуцентами будуть *Bacillus subtilis* 3/Re (ГКПМ №263) та *Bacillus licheniformis* 31/Re (ГКПМ №264).

1.2. Морфолого-цитологічні ознаки

За визначником Берджі бактерії роду *Bacillus* це прямі палички, 0,5-2,5 * 1,2-10 мкм, із закругленими або «обрубленими» кінцями, часто в парах або ланцюжках. Грампозитивні. Слизових капсул або чохлів не утворюють. Рухомі за рахунок перитрихіальних джгутиків. Ендоспори овальні чи іноді сферичні або циліндричні, дуже стійкі до багатьох несприятливих впливів. У клітині утворюється не більше однієї спори. Споруляція не подавляється в атмосфері повітря. Аероби або факультативні анаероби. Ставлення до підвищеної температури, рН та солоності сильно варіює. Хемоорганотрофи; метаболізм бродильного або дихального типу. Зазвичай каталазопозитивні.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

Виявляються в різноманітних середовищах існування. Деякі види патогенні для хребетних або безхребетних [7].

Штам *Bacillus subtilis* 3 (В-5007 або ВКПМ-В 2335) - це грампозитивні аеробні спороутворюючі палички розміром $2,7 * 0,8$ мкм, розташовані поодинокі або у вигляді ланцюжків. Клітини рухливі, утворюють спори овальної форми, які розташовуються в центрі клітини. При спороутворенні клітини не роздуваються. Аероб; не росте в анаеробних умовах [8]. На рис.1 зображено колонію *Bacillus subtilis*.

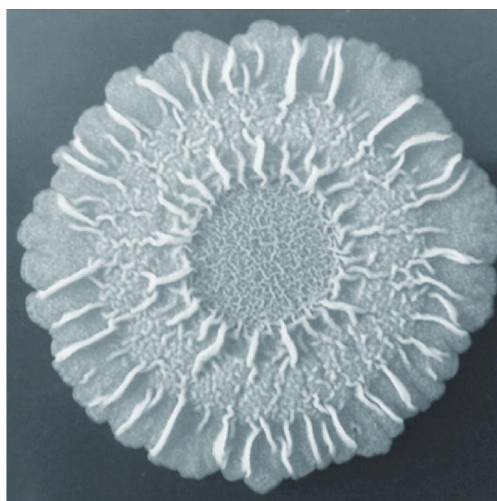


Рис.1 Колонія *Bacillus subtilis* [9]

Штам *Bacillus licheniformis* 31 (В-5514 або ВКПМ-В 2336) – це грампозитивні спороутворюючі палички розміром $2,5 * 0,6$ мкм, розташовуються в основному у вигляді ланцюжків. Клітини рухливі, утворюють спори овальної форми, розташовані в центрі клітини. При спороутворенні клітини не роздуваються. Може рости в анаеробних умовах [8]. На рис.2 зображено колонію *Bacillus licheniformis*.



Рис.2 Колонія *Bacillus licheniformis* [10]

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

1.3. Культуральні ознаки

Для *B.subtilis* 3: на поживному середовищі на м'ясопептонному агарі (МПА) або середовищі Гаузе № 2 після інкубації за температури $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, протягом 24 год, утворює матові складчасті колонії тілесного кольору з порізними краями, легко знімаються мікробіологічною петлею з агаризованого середовища.

В м'ясопептонному бульйоні (МПБ) або бульйоні Хоттингера утворює білувату плівку, викликаючи невелике помутніння середовища [8].

Для *B.licheniformis* 31: на поживному середовищі МПА або Гаузе № 2 після інкубації за температури $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, протягом 24-48 год, утворює гладкі круглі коричневі колонії, які погано знімаються петлею з агаризованого середовища [8].

У МПБ дає придонний ріст з помутнінням середовища [8].

1.4. Фізіолого-біохімічні ознаки

Мікроорганізми роду *Bacillus* належать до хемоорганотрофів. Тип їх енергетичного метаболізму - бродильний або дихальний.

Фізіолого-біохімічні ознаки промислових штамів бактерій наведені нижче у таблиці 1.

Таблиця 1. Фізіологічні та біохімічні ознаки штамів *B.subtilis* 3 і *B.licheniformis* 31 [8, 22]

Ознаки	<i>B.subtilis</i> 3	<i>B.licheniformis</i> 31
1	2	3
Ферментація		
- ГЛЮКОЗИ	+	+
- АРАБІНОЗИ	+	-
- КСИЛОЗИ	+	+

1	2	3
- маніту	+	+
Утворення кислоти і газу з глюкози	-	-
Утворення кислоти з глюкози	+	+
Утилізація		
- цитрату	+	+
- пропіонату	-	+
Гідроліз		
- крохмалю	+	+
- сечовини	-	-
- казеїну	+	+
- тирозину	-	-
Редукція нітратів	+	+
Утворення газу з NO_3^- в анаеробних умовах	-	+
Знебарвлення метиленового синього	+	+
Каталаза	+	+
Реакція Фогес-Проскауера	+	+
Аргініндегідролаза	-	+
Лецитиназа	-	-
Гіалуронідаза	-	-
Гемолітична активність	-	-
Утворення глобул полі- β -оксимасляної кислоти на глюкозному агарі	-	-
Лізоцимна активність	+	+
Ріст при 50 °C	+	+
Ріст при 65 °C	-	-

1	2	3
Ріст у 7% NaCl	+	+
Стійкість до впливу шлункового соку	+	+
Стійкість до впливу жовчі	+	+
Адгезивна активність	-	-
Антагоністична активність (зони затримки росту тест-штамів в мм на середовищі Гаузе №2)	Не менше 10-15	Не менше 10-15

Клітинна стінка обох видів містить муреїн, тейхоєві кислоти, ліпотейхоєві кислоти і білки. *B.subtilis* і *B.licheniformis* здатні до бутандіолового бродіння; гідролізують тригліцериди; виробляють цитратну пермеазу та цитохром С. *B.licheniformis* продукує протеазу, що витримує високі рівні рН (до 11 з оптимумом рН = 9-10) [11,12]. Особливістю бактерій роду *Bacillus* є утворення спор при несприятливих умовах, що за рахунок багатьох факторів (спорова оболонка, підвищений вміст дипіколінової кислоти, низька проникність спорової оболонки, каротиноїди, хелатні комплекси з іонами металів тощо) забезпечують безпечність внутрішнього вмісту клітини та можливість для подальшої життєдіяльності за нормальних умов [13].

Бактерії роду *Bacillus* можуть розмножуватись симетрично, утворюючи дві дочірні клітини (бінарне ділення), або асиметрично, утворюючи ендоспору, яка може залишатися життєздатною протягом десятиліть і стійкою до несприятливих умов навколишнього середовища, таких як посуха, солоність, екстремальний рН, радіація та розчинники. Ендоспора утворюється під час харчових стресів і за рахунок використання гідролізу, що дозволяє організму зберігатися в навколишньому середовищі до тих пір, поки умови не стануть сприятливими. До процесу спороношення клітини можуть стати рухливими, утворюючи джгутики, поглинати ДНК з навколишнього середовища або виробляти антибіотики.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

Оптимальна температура росту для *B.subtilis* - (+25)-(+35)°C. При 37 °C починають утворюватись спори [13,14]. Бактерії можуть рости в такому діапазоні рН 5,0-8,5[15]. Оптимальний рН для росту бактерій - $7 \pm 0,5$ [16].

Оптимальна температура росту *B.licheniformis* – (+50) °C, але вона також може вижити при набагато більш високих температурах до (+70)°C [17]. Її оптимальна температура для секреції ферментів - (+37) °C. Оптимальний рН для росту $7,0 \pm 0,5$ [18]. Нижня межа рН для росту *B.licheniformis* досі не досліджена, але верхня межа становить рН = 12 [19].

Для нормального росту і розвитку даним бактеріям необхідні субстрати природного походження із складними формами азоту. Традиційними поживними середовищами для вирощування бактерій роду *Bacillus* є м'ясо-пептонні середовища (агар та бульйон), середовище Хоттингера, печінкові та м'ясні відвари тощо. Проте за великих обсягів виробництва ці середовища економічно не вигідні. Тому для глибинного вирощування бактерій *B.subtilis* та *B.licheniformis* запропоновано рідкі поживні середовища на основі недефіцитних та відносно дешевих компонентів (гідролізат казеїну, кукурудзяний екстракт, соєве борошно, крейда, крохмаль та мінеральні солі). Основною вимогою під час складання цих середовищ було забезпечення оптимальних для росту бактерій концентрацій азотного та вуглецевого живлення, г/дм³: для *B. subtilis* - аміний азот 0,27-0,31; глюкоза 8-14; для *B.licheniformis* - аміний азот 0,37-0,41; глюкоза 18-23, а також мінеральних солей (у дужках наведено концентрації для *B.licheniformis*), г/дм³: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,375 (0,8); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001 (0,001); $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,030 (0,016); NaCl - 1,0 (1,0); CaCl_2 - 0,15 (0,15) [20].

Експериментально доведено доцільність використання модифікованого поживного середовища для вирощування *B.subtilis* та *B. licheniformis* такого складу, г/дм³: кукурудзяне борошно - 75; крейда - 14; крохмаль - 20; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,5 [21].

Штами бактерій *B.subtilis* 3/Re та *B.licheniformis* 31/Re є стійкими до широкого спектру антибіотиків: ампіциліну, метилциліну, оксациліну,

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

бензилпеніциліну, моксалактаму, цефоперазону, цефотаксиму, цефтазидиму, цефтизоксиму, цефуроксиму, цефтріаксону, ванкоміцину, кліндаміцину, піперациліну, поліміксину Е, хлорамфенікону та азтреонаму [22].

1.5. Серологічні ознаки та фактори патогенності

Дані штами мікроорганізмів не є імуногенними та патогенними, саме тому не викликають імунну відповідь. Дані мікроорганізми не є елементами природної мікробіоти кишківника, але мають властивість до самоелімінації, тобто самовільного видалення з організму [23].

Безпечність штамів *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis* була доведена у багатьох дослідках, а тому Управління з контролю якості продовольчих та лікарських засобів США (FDA) надало їм статус GRAS (Generally Recognized as Safe), тобто «як правило безпечних» [24,25].

Але також існує застереження про те, що FDA присвоїло статус GRAS тільки тим видам *Bacillus*, які є продуцентами ферментів, і він не поширюється на застосування їх в якості пробіотиків. Тому дані штами повинні бути протестовані на безпечність незалежною трьохсторонньою групою кваліфікованих експертів. Крім того, є важливою перевірка таких факторів: профіль антибіотикорезистентності, продукцію блювотного (emetic) фактора, ентеротоксинів, стійкість до соків шлунка, кишківника і до жовчі. Детальна схема перевірки продукції токсину відпрацьована SCAN. Ця перевірка важлива, оскільки заборонено в якості пробіотиків використовувати штами, які продукують токсин(-и) і здатні до передачі стійкості до антибіотиків [26].

1.6. Поширення в природі та стійкість до зовнішніх факторів

Основним місцем поширення ендоспор, що утворюють мікроорганізми роду *Bacillus*, є ґрунт. *Bacillus subtilis* найчастіше зустрічається в ґрунтових

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

середовищах та у великому скупченні рослин. Ці мезофільні бактерії є суворими аеробами. Таким чином, вони, частіше за все, можуть бути знайдені в горизонтах поверхневих ґрунтів О та А, де концентрація кисню найбільша, а температури відносно м'які. У конкурентному середовищі, коли рівень вуглецю, азоту та фосфору-поживних речовин падає нижче оптимального порогу бактерії, мікроорганізм утворює спори. Вчені продемонстрували, що *Bacillus subtilis* може утворювати антибіотики та інші фактори антагоністичної активності при утворенні спор. Утворення спор збільшує шанс *B. subtilis* на виживання, оскільки організм, виробляючи антибіотики та фактори антагоністичної активності, може вбивати навколишні грампозитивні мікроби, які змагаються за ті самі поживні речовини. Коли поживних речовин, необхідних для розвитку бактерій, вдосталь, вони виявляють високу метаболічну активність. Прикладами антибіотиків, які може виробляти *Bacillus subtilis*, є поліміксин, складнідин, субтилін та мікобакцилін. Багато видів бактерій роду *Bacillus* здійснюють деградацію таких полімерів, як білок, крохмаль та пектин. Тому вважається, що вони є важливим фактором вуглецевого та азотного циклів. *Bacillus subtilis* підтримує живлення рослин. Будучи представником роду *Bacillus*, ця бактерія часто відіграє роль у поповненні ґрунтових поживних речовин, підтримуючи наземний цикл вуглецю та цикл азоту. Бактерії *Bacillus subtilis* утворюють грубі біоплівки на поверхні повітря та води, що є щільними конгломератами мікроорганізму. Вони дозволяють контролювати інфекції рослинних патогенів. Конгломерати біоплівки *B. subtilis* утворюють симбіоз з системами кореневищ рослин. Рослина отримує з цього користь, оскільки *B. subtilis* забезпечує попереджувальну колонізацію. Превентивна колонізація заважає іншим збудникам заразити рослину, оскільки *B. subtilis* має перевагу бути першим на ділянці [27].

Цей вид зазвичай зустрічається у верхніх шарах ґрунту, і *B. subtilis* вважається нормальним коменсалом кишок у людини. Дослідження 2009 року порівнювало щільність спор, виявлених у ґрунті (близько 10^6 спор на

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

грам), з щільністю, що міститься у людському калі (близько 10^4 спор на грам). Кількість спор, виявлених у кишечнику людини, було занадто великим, щоб його можна було пояснити виключно споживанням через забруднення їжею [28].

Bacillus licheniformis утворює спори в ґрунті. Шлях, який призводить до утворення ендоспор, починається, коли бактерія відчуває нестачу поживних речовин. Ці спори досить стійкі до впливу тепла, холоду, радіації та інших екологічних навантажень. За хороших умов спори проростатимуть і вироблятимуть вегетативні клітини. *B.licheniformis* виробляє різноманітні позаклітинні ферменти, які пов'язані з кругообігом поживних речовин у природі. Це апатогенний ґрунтовий організм, який здебільшого пов'язаний з рослиною та рослинними матеріалами в природі. *B. licheniformis* також відомі, як такі що викликають харчові отруєння у людини; особливо високі показники забруднення мають такі продукти, як сире молоко, молочні продукти, овочі, перероблене дитяче харчування та варене м'ясо [29].

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Пробіотик – це препарат на основі живих мікроорганізмів і речовин мікробного походження, що при природному способі введення здійснюють позитивний ефект на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції організму хазяїна завдяки стабілізації і оптимізації функції його нормальної мікрофлори [30].

Класифікації пробіотиків засновуються на кількості мікроорганізмів, що входять до складу препарату, їх родовій приналежності або наявності додаткових компонентів у складі препарату. У таблиці 2.1 наведено одну з сучасних класифікацію пробіотичних продуктів та препаратів.

Таблиця 2.1. Препарати і продукти для відновлення нормальної мікрофлори [31].

№	Група препаратів (продуктів)	Діючі компоненти
1	Пробіотики (фармацевтичні препарати, спеціальні добавки та біологічно активні добавки)	Жива біомаса фізіологічної мікрофлори
2	Препарати на основі інактивованих мікроорганізмів	Інактивована біомаса пробіотичної мікрофлори
3	Пребіотики	Речовини, що сприяють селективному збільшенню популяції фізіологічної мікрофлори у кишківника
4	Синбіотики	Комплекс пробіотика та пребіотика
5	Препарати метаболітного типу	Фізіологічно активні метаболіти пробіотичної мікрофлори

					ДП 6221 00.000 ПЗ				
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розробив		Щербина В.Ю.			РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.							Д	22	120
							КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Яловенко О.І.							
Затвер.									

6	Продукти функціонального харчування	Живі мікроорганізми, їхні метаболіти та/або інші сполуки, що позитивно впливають на кишкову мікрофлору
7	Нутрицевтики	Поживні субстрати, що сприяють оздоровленню кишківника

За однією з класифікацій (за В.П. Широбоковим) препарати пробіотиків, що використовуються нині у клінічній практиці, поділяють на сім поколінь [29]:

I. Пробіотики на основі монокультур облігатної або факультативної нормофлори (Біфідобактерин, Колібактерин, Лактобактерин)

II. 2-4-компонентні пробіотики на основі облігатної, факультативної або транзиторної мікрофлори (Біфікол, Біфіформ, Лінекс)

III. Пробіотики на основі транзиторних мікроорганізмів (Бактисубтил, Ентерол-250, Аеробакт)

IV. Синбіотики (комбінація пробіотиків і пребіотиків) та іммобілізовані пробіотики (Екстралакт, Біфілакт-екстра, Пробіфор)

V. Препарати на основі рекомбінантних генно-інженерних штамів (Субалін)

VI. Полікомпонентні пробіотики на основі лакто- та біфідобактерій (Полібактерин, Симбіолакт, Біфідум-Мульти-1,2,3)

VII. Мультипробіотики (Симбітер, Апібакт)

Препарат Біоспорин являється пробіотиком II покоління [32], бо містить живі культури транзиторної флори двох штамів *Bacillus subtilis* 3 та *Bacillus licheniformis* 31 для підвищення ефективності препарату за рахунок посилення фагоцитарної активності крові та індукції інтерферону. Компоненти в препараті за патентом знаходяться у наступному співвідношенні на одну дозу препарату, об. % [33]: штам *Bacillus subtilis* 3 у кількості $4 \cdot 10^9$ - $16 \cdot 10^9$ кл/мл – 47%, штам *Bacillus licheniformis* 31 у кількості $2 \cdot 10^8$ - $3 \cdot 10^9$ кл/мл, наповнювач – до 100%.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		23

Біоспорин зазвичай рекомендований як дієтична добавка до раціону харчування, що є джерелом активних культур *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis* для дорослих та дітей від народження [34].

По класифікації АТС (Anatomical Therapeutic Chemical Classification System, або Анатомічно-терапевтично-хімічна класифікація) відноситься до групи «А» - «Препарати, що впливають на травну систему та обмін речовин», до «А07» Протидіарейні, кишкові протизапальні та проти інфекційні препарати, до «А07F» – Антидіарейні мікроорганізми, до «А07F 50» - Інші мікроорганізми, комбінації [29, 35].

2.2. Схема хімічних перетворень

Для проявлення антагоністичної активності обраних штамів дуже важливим є синтез дипіколінової кислоти, яка крім виділення антибіотикоподібних речовин, змінює рН кишківника в кислу сторону, тим самим потенціює ефект ендогенних пребіотичних факторів, в результаті чого створюються сприятливі умови для заселення кишківника нормофлорою та відновлення власної мікрофлори. Дипіколінова кислота проявляє антагоністичну активність у відношенні до культур *Staphylococcus aureus*, *Candida*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella*, *Campylobacter Coli* та *Jeuni*, *Citrobacter*, *Streptococcus pneumonia* [45]. Цей фактор є унікальним для бактерій роду *Bacillus*, бо він присутній тільки в їх ендоспорах. Дипіколінова кислота у спорах знаходиться у вигляді хелатного комплексу з двома іонами кальцію. У природньому механізмі існування в ендоспорах вона потрібна для захисту ДНК від зовнішніх впливів [46]. Механізм її утворення у спорах добре вивчений, він пов'язаний із синтезом лізину та аспарагінової кислоти. З аспартату за допомогою аспартаткінази утворюється 4-аспартилфосфат. Після цього, із 4-аспартилфосфату, за допомогою ферменту аспартат-напівальдегід дегідрогенази, утворюється аспартат-4-напівальдегід. Аспартат-4-напівальдегід також може

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

утворюватись з гомосерину за допомогою ферменту гомосериндегідрогенази. Фермент дигідродипіколінатсинтаза відповідає за третій етап, продукуючи L-2,3-дигідродипіколінат. Синтаза дипіколінової кислоти відповідає за завершальний етап, продукуючи дипіколінову кислоту. [47,48,49].

В основному всі корисні речовини, які містять продуценти, утворюються внаслідок конструктивного метаболізму в природному вигляді. У роду *Bacillus* він забезпечується бутандіоловим (змішаним) бродінням, в основі якого лежить гліколіз [50].

Гліколіз – це анаеробний розклад вуглеводів, головним чином глюкози під дією ферментів, що супроводжується синтезом АТФ. Кінцевим продуктом процесу є піровиноградна кислота та молочна кислота. Загальну схему перетворень глюкози на піруват зображено на (рис. 2.1.).

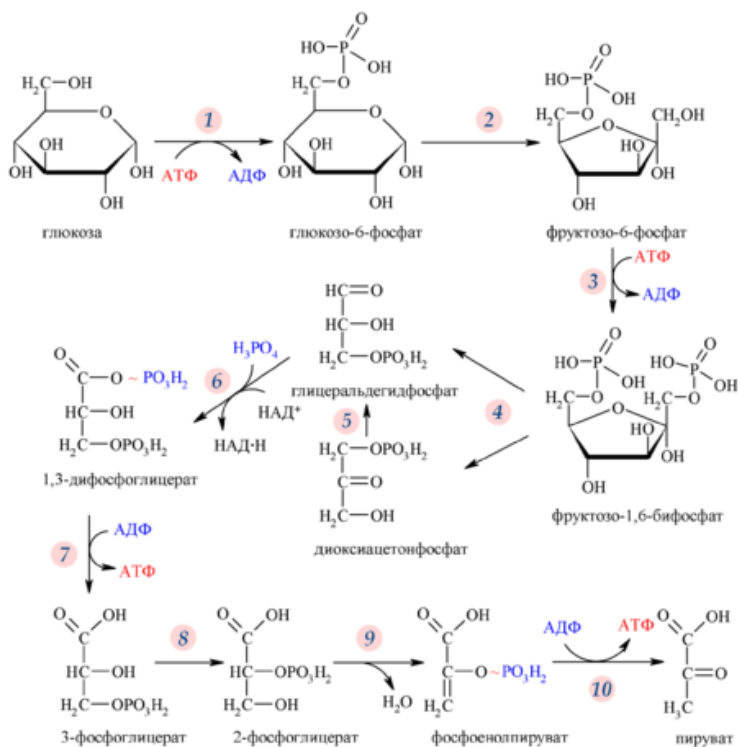


Рис. 2.1. Шлях Ембдена-Мейергофа-Парнаса (гліколіз): 1 - гексокіназа; 2 - глюкозофосфатізомераза; 3 - фосфофруктокіназа; 4 - фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза; 5 - триозофосфатізомераза; 6 - 3-фосфогліцеральдегід-дегідрогеназа; 7 - фосфогліцерокіназа; 8 - фосфогліцеромутаза; 9 - енолаза; 10 – піруваткіназа [51].

Для більшості представників роду *Bacillus* характерно бродіння з утворенням 2,3-бутандіолу, гліцерину і CO₂, а також невеликих кількостей молочної кислоти і етанолу. Бутандіолове бродіння, здійснюване бактеріями роду *Bacillus*, можна представити таким чином на рис.2.2:

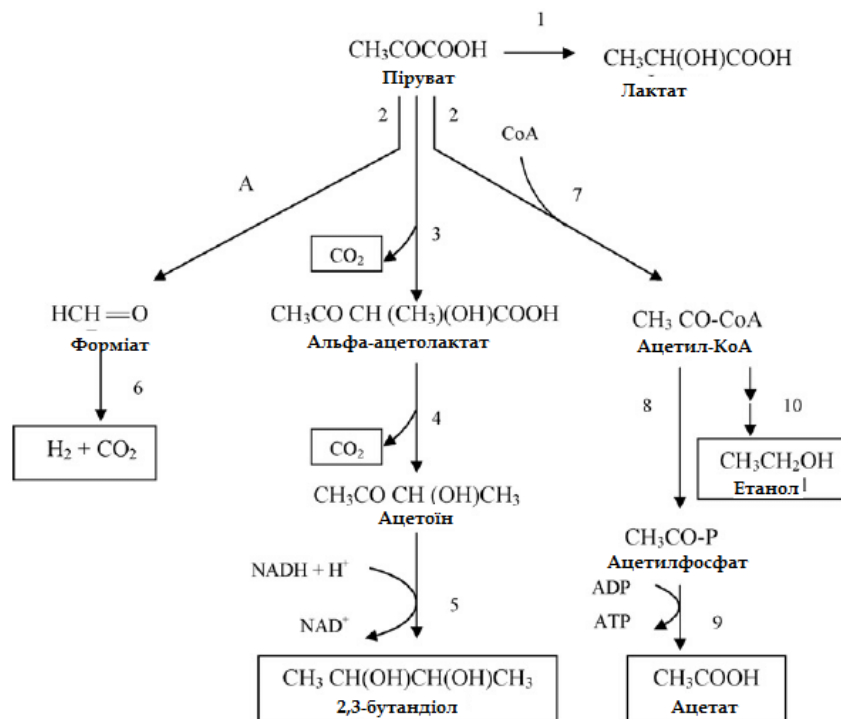


Рис. 2.2. Бутандіолове (змішане) бродіння: 1 – лактатдегідрогеназа, 2 – піруват-форміатліаза, 3 – форміат-гідрогенліаза, 4 – альфа-ацетолактатсинтаза, 5 – альфа-ацетолактатдекарбоксилаза, 6 – 2,3-бутандіолдегідрогеназа, 7 – фосфотрансацетилаза, 8 – ацетаткіназа, 9 – ацетальдегід- / алкогольдегідрогеназа [52].

Перехід бактерій до спороутворення (споруляції) спостерігається зазвичай при виснаженні живильного субстрату, нестачі джерел вуглецю, азоту, фосфору, зміні рН і т. д. Процес спороутворення енергозалежний від джерела надходження енергії, тому споруляцію поділяють на ендотрофну і екзотрофну. Ендотрофна споруляція здійснюється за рахунок внутрішнього запасу енергії клітини і не потребує додаткових речовин. У разі екзотрофних процесів використовується екзогенна енергія, яка надходить ззовні. Здатність до утворення спор детермінується генами *spo*, яких у бактерій *Bacillus subtilis*

більше 100. Кожен з *spo*-генів відповідає за ті чи інші стадії споруляції [53,54].

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Одна терапевтична доза препарату Біоспорин у флаконі містить 50% життєздатних спор і живі мікробні клітини *Bacillus subtilis* 3/Re - $10 \cdot 10^9$ та *Bacillus licheniformis* 31/Re - не менше $1,6 \cdot 10^9$ КУО. Кінцева вологість продукту - 3-4%. Препарат буде випускатися у вигляді мікробіологічно чистого ліофілізованого порошку (пориста маса) у флаконах. Перед сублімаційною сушкою за технологією додається кріопротекторне захисне середовище на основі желатину та сахарози. Відповідно допоміжні речовини: желатин, сахароза [46].

Біомаса мікроорганізмів в білкових речовинах в значній кількості містить весь спектр незамінних амінокислот (аланін, фенілаланін, лізин, лейцин, серин, глютамін, гістидин, треонін, триптофан тощо).

Всі речовини, що мають визначену структуру у складі захисного середовища висушування, повинні бути мікробіологічно чистими, тобто пройти стерилізацію.

2.4. Методи очистки цільового продукту

Цільовим продуктом є концентрована висушена та мікробіологічно чиста біомаса клітин заданих продуцентів. Технологія не потребує додаткових методів очистки препарату.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Цільовий продукт – пробіотичний препарат «Біоспорин», що застосовується в основному для лікування дисбактеріозу, харчових алергій та відновлення балансу природної мікрофлори кишківника. Основним активним агентом виступають ендоспори бацил *Bacillus subtilis* 3/Re та *Bacillus licheniformis* 31/Re. Лікувально-профілактичну дію Біоспорину обумовлено комплексом його властивостей, що впливають як на макроорганізм, так і на патогенну і умовно-патогенну мікрофлору.

По-перше, механізм дії заключається у тому, що, при пероральному введенні пробіотиків або чистих культур, які входять до їх складу, частина життєздатних бактерій (приблизно 0,1%) в перші хвилини проникає в кров і органи лабораторних тварин, не викликаючи при цьому ніяких патологічних процесів. У подальшому бактерії швидко елімінуються як з крові, так і з внутрішніх органів. При одноразовому пероральному введенні цього пробіотику спостерігається поступова активація макрофагів з максимумом через 4 години. Дослідження довели, що пробіотики з бацил є ефективними індукторами ендогенного інтерферону. Можливо, захисний ефект Біоспорину при вірусних інфекціях пов'язаний з індукцією ендогенного інтерферону, оскільки виявлена кількість інтерферону при його клінічних дослідженнях на людях була достатньою для противірусного захисту [56,57]. Нижче на рисунку 2.3 зображена схема механізму дії Біоспорину на організм.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28



Рис.2.3. Схема механізму імуномодулюючої дії Біоспорину [29]

По-друге, препарат має бактерицидний і бактериостатичний вплив на патогенну і умовно-патогенну мікрофлору при нетривалій фіксації клітин на слизових шлунка, а потім і кишківника за рахунок подальшого утворення при підвищенні концентрації речовин, що мають антимікробну дію [56]. Також препарат характеризується високою антагоністичною активністю щодо широкого спектра патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів і може застосовуватися спільно з антибіотиками.

Початком пробіотичної дії Біоспорину слід вважати контакт препарату з епітеліальними клітинами шлунково-кишкового тракту організму-реципієнта і з подальшою дифузією на слизові протеолітичних ферментів, каталази, дипіколінової кислоти. Все це створює умови для активування травних і обмінних процесів. Далі, протягом двох годин, близько 90% спор переходять в вегетативні форми з інтенсивною продукцією фізіологічно активних речовин, які впливають на процеси травлення і на патогенні

мікроорганізми. Біоспорин потенціює елімінацію патогенної мікрофлори, а через невеликий проміжок часу (в середньому до дев'яти днів), будучи транзиторним учасником кишкового мікробіоценозу, самоелімінується. Слід зазначити, що при зниженій секреторній функції шлунка і підвищеній перистальтиці травного каналу, типових для функціональних змін шлунково-кишкового тракту, а також для гострих кишкових інфекцій (ГКІ), вегетативні форми бацил виявляються в кишечнику вже через кілька хвилин після введення препарату. Тому швидка клінічна ефективність, як при комбінованій, так і при монотерапії ГКІ у дітей різних вікових груп, препарату Біоспорин цілком виправдана [45].

Біоспорин проявляє високу антагоністичну активність по відношенню до патогенних і умовно-патогенних мікробів і не впливає на нормальну мікрофлору кишківника. Антагоністична дія бацил здійснюється за рахунок продукції різних за своєю природою біологічно активних речовин: поліпептидних антибіотиків (більше 200 антибіотикоподібних речовин, у багатьох випадках з синергетичним ефектом, - поліміксини, бацитрацин, тіротріциновий комплекс, граміцидин С, субтилін, едеїн, мікробацилін і ін.), лізоциму, літичних ферментів, які володіють як бактерицидним, так і бактеріостатичним ефектом. Крім того, *Bacillus subtilis* і *Bacillus licheniformis* в процесі своєї життєдіяльності потенціюють вироблення в епітелії слизової шлунково-кишкового тракту антимікробних пептидів. Дипіколінова кислота у складі препаратів проявляє антагоністичну активність по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Candida*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella*, *Campylobacter Coli* і *Jeuni*, *Citrobacter*, *Streptococcus pneumonia* [35]. Причому у нових штамів, що є більш резистентними до різних родів антибіотиків, *Bacillus subtilis* 3/Re і *Bacillus licheniformis* 31/Re, антагоністична активність проявляється краще, ніж в оригінальному складі препарату, що показано у таблиці 2.2 [31].

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						30
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 2.2. Порівняння антагоністичної активності нових і оригінальних пробіотичних штамів Біоспорину відносно патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [31].

Продуценти	Зони затримки росту (в мм)						
	<i>S.sonnei</i> 32	<i>S.typhimurium</i> 11	<i>S.aureus</i> 209	<i>S.aureus</i> Нікіфоров	<i>C.albicans</i> 690	<i>P.mirabilis</i> 24 Н	<i>E.coli</i> 157
<i>Bacillus subtilis</i> 3/Re	16±1,2	15±2,1	28±2,3	30±1,3	33±3,2	18±1,1	18±1,1
<i>Bacillus subtilis</i> 3	10±1,1	10±1,1	18±1,6	17±1,5	20±2,5	11±2,1	10±2,1
<i>Bacillus licheniformis</i> 31/Re	17±1,4	15±1,5	22±2,1	21±1,1	25±2,2	19±1,2	18±1,4
<i>Bacillus licheniformis</i> 31	11±1,2	11±2,3	15±1,7	15±1,2	16±1,2	10±1,1	10±1,0

Також проводилось тестування, внаслідок якого визначили який компонентний склад Біоспорину з новими штамми є найкращим для використання судячи з антагоністичної активності серій (табл.2.3, 2.4).

Таблиця 2.3. Компонентний склад різних серій препарату Біоспорин [31].

Використовувані культури	Кількість живих мікробних клітин (*10 ⁹) в 1 мл суспензії при отриманні різних варіантів Біоспорину				
	I	II	III	IV	V
<i>B.subtilis</i> 3/Re	4	0,2	4	10	16
<i>B.licheniformis</i> 31/Re	4	4	0,2	1,6	3

Таблиця 2.4. Порівняння антагоністичної активності Біоспорину при різних компонентних складах [31].

Варіант препарату	Зони затримки росту тест-культур, мм			
	S.sonnei 32	S. typhimurium 11	S.aureus 209	C.albicans 690
I	9	8	18	27
II	0	0	15	5
III	10	10	27	28
IV	15	16	30	29
V	10	10	29	28

Виходячи з результатів тестувань, найкращим компонентним складом є IV, в якому на 1 мл суспензії: *B.subtilis* 3/Re – $10 \cdot 10^9$ КУО, *B.licheniformis* 31/Re – $1,6 \cdot 10^9$ КУО.

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

Рід *Bacillus* є продуцентами багатьох антибіотичних та біологічно активних сполук, мають достатньо високу швидкість росту, безпечні для оточуючого середовища – це все робить з них дуже цінних продуцентів, а тому для них досить добре вивчені методи генетичного аналізу.

В клітинах *Bacillus subtilis* присутня лише одна молекула ДНК. Бактерія має одну кругову хромосому. Загальний розмір всієї ДНК становить 4,214,814 bp (4,2 Mbp). 4 100 генів кодують білки. 53% генів, що кодують білок, спостерігаються лише один раз, в той час як 25% геному належать до сімейства генів, які зазнали дублювання генів [49].

Значна частина геному відповідає застосуванню джерел вуглецю. 192 з 4100 генів вважаються незамінними та ще 79 вважаються важливими. Більшість незамінних генів беруть участь у метаболізмі. Половина незамінних генів відповідає за обробку інформації, одна п'ята з них відповідає за синтез клітинної стінки, поділ і форму клітин, а десята частина з них відповідає за забезпечення енергообміну в клітині. Основні гени, кодуючі функції яких невідомі, - це 4% [50]. Бактерії *Bacillus subtilis* здатні виділяти антибіотики у великій кількості до зовнішньої частини клітини [51]. П'ять генів сигнальної пептидази були важливими для цієї секреторної функції. Багато генів клітин *Bacillus subtilis* відповідають за синтез антибіотиків [49].

Повна послідовність нуклеотидів *Bacillus licheniformis* складається з геному ATCC 14580, який має кругову хромосому 4 222 366 bp (4,22 Mbp), яка містить 4 208 передбачуваних білків, що кодують білок (середній розмір

					ДП 6221 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Щердина В.Ю.			РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	33
						Аркушів	
						120	
Керівник		Яловенко О.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.						ФБТ	

873 bp), 7 оперонів рРНК та 72 тРНК гени. Вміст ГК становить 46,2%, плазмід не виявлено [52].

У хромосомі *B.licheniformis* є великі області, схожі на *Bacillus subtilis*. Оскільки приблизно 80% кодуючої послідовності *B. licheniformis* містять ортологи *B. subtilis*, вона вважається частиною групи *subtilis*. Але, хоча і схожі на *B. subtilis*, вони відрізняються за кількістю та розташуванням профагів, транспозитивних елементів, позаклітинних ферментів та вторинних оперонів метаболічного шляху [52].

У таблиці 3.1.1 наведено порівняння вивчених штамів видів *B.subtilis* та *B.licheniformis*.

Таблиця 3.1.1 Порівняння особливостей геномів *B.subtilis* 168 та *B.licheniformis* ATCC 14580 [52].

Ознака	<i>B.subtilis</i> 168	<i>B.licheniformis</i> ATCC 14580
Розмір хромосоми (bp)	4,214,814	4,222,336
Вміст G+C (%)	43,5	46,2
Кількість кодуючих білки послідовностей	4106	4208
Середня довжина кодуючої ділянки (bp)	896	873
Відсоток кодуючих ділянок (%)	87	86
Оперони рРНК	10	7
Кількість тРНК	86	72
Фаг-асоційовані гени	268	71

Гени	транспозази	IS	0	10
елементів				

3.1.1. Наявність генетичних карт продуцентів або типового представника групи.

Генетичні карти продуцентів Біоспорину поки що невідомі, але наразі існують генетичні карти модельних штамів для обох видів. Модельними штамми для *B.subtilis* та *B.licheniformis* є *Bacillus subtilis* 168 та *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 відповідно.

На прикладі *Bacillus subtilis* 168 було проведене картування генів і укладено кільцеву карту геному (рисунок 3.1.1.1).

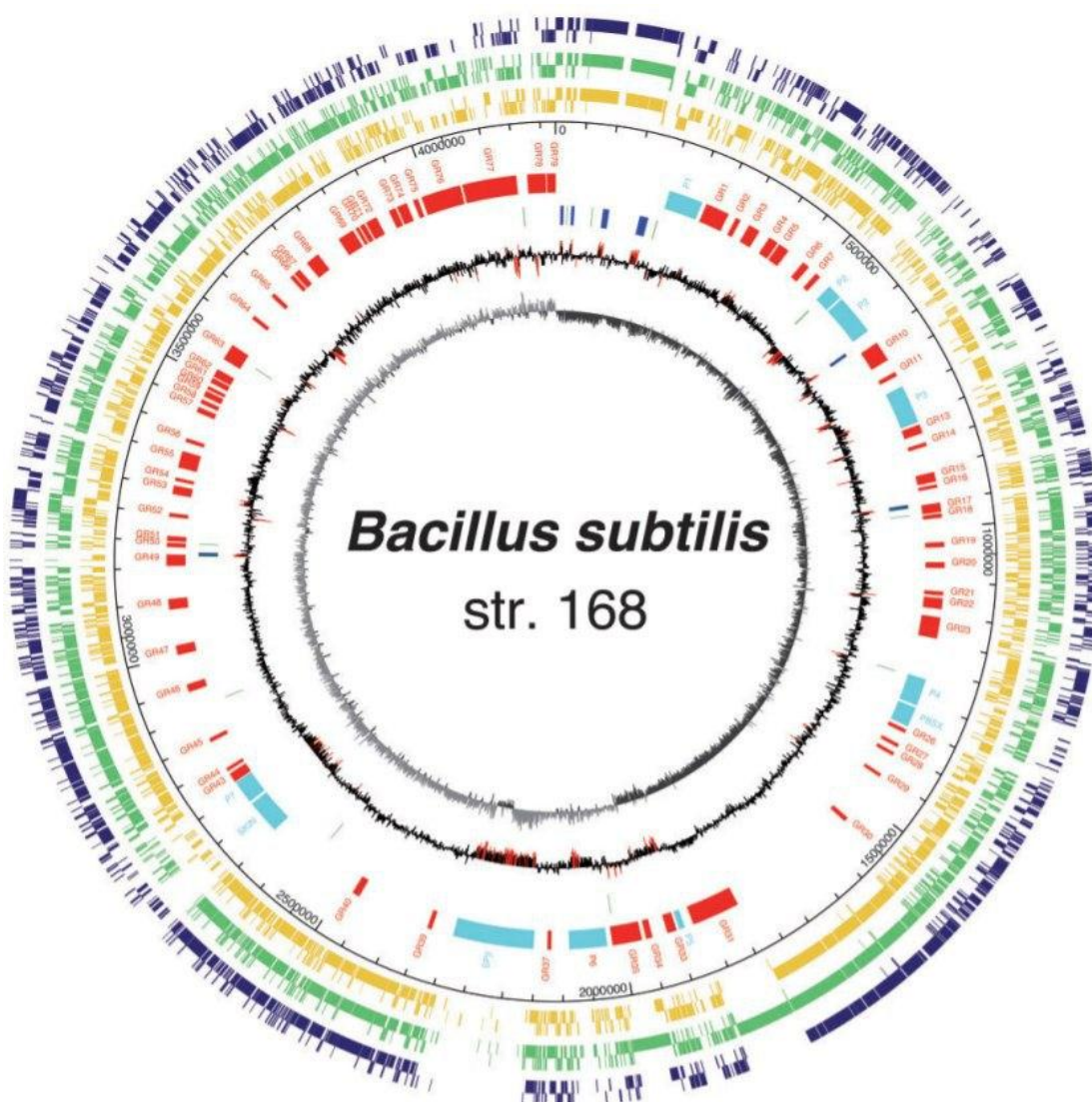


Рис.3.1.1.1 Генетична карта штаму *B. subtilis* 168 [53]

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

На рисунку 3.1.1.1 показане кругове представлення геному *B. subtilis* 168 за кількома специфічними ознаками генома. У колах відображається таке, зсередини назовні: 1 - Відношення GC ($G+C/G-C$ за допомогою ковзаючого вікна 1 кб). 2 - Відхилення GC (середній вміст GC у вікні 1 кб - загальне середнє значення GC). Червоні зони означають, що відхилення вище 1,5 стандартного відхилення. 3 - тРНК (темно-зелений) та рДНК (синій). 4 - Розташування геномних областей із специфічними ознаками, що відрізняють їх від середньої послідовності. Ділянки, пофарбовані в світло-блакитний колір, вказують області фагового походження. 5 - Шкала. 6, 7, 8 - Гени, що мають передбачувані ортологи у інших видів *Bacillus* (*B.licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* та *B. pumilus* відповідно) [53].

На прикладі *B.licheniformis* ATCC 14580 було проведене картування генів і укладено кільцеву карту геному (рисунок 3.1.1.2).

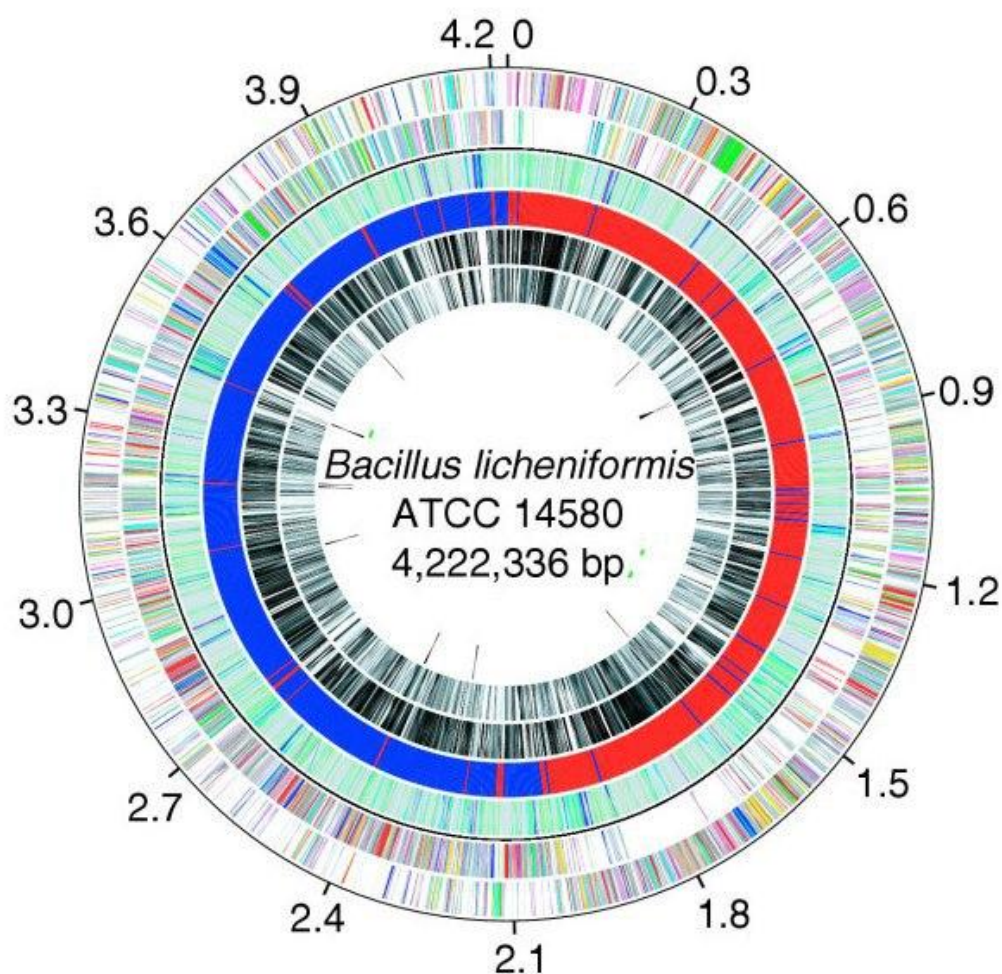


Рис. 3.1.1.2. Генетична карта штаму *B.licheniformis* ATCC 14580 [52].

На рисунку 3.1.1.2 зображене кругове представлення хромосоми *B.licheniformis* ATCC 14580. Кола нумеруються від 1 (зовнішній) до 7 (внутрішній). У колах 1 та 2 показано розташування прогнозованих кодуючих послідовностей на ланцюжках + та - відповідно; коло 3 - відсоток G + C; коло 4 - GC відношення (G-C/G+C); коло 5 - гомологія з *B. subtilis* 168; коло 6 - гомологія з *B. halodurans*; коло 7 показує положення дев'яти копій елемента послідовності вставки IS3Bli1 та передбачуваного гена транспозази; невеликі зелені смуги всередині кола 7 позначають положення можливих елементів профага [52].

3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.

Цільовим продуктом є висушена біомаса мікроорганізмів, а тому розглянуто вивченість механізмів експресії генів, що відповідають за конструктивний метаболізм організмів, а саме: за асиміляцію джерела карбону, нітрогену та сульфуру. Також немаловажним є механізм експресії генів, відповідаючих за синтез дипіколінової кислоти, як важливий фактор антагоністичної активності препарату, що являється показником ефективності пробіотичного препарату.

Вуглецевий обмін. *B.subtilis* має так звану «підручникову» організацію його метаболізму вуглецю (більше описано в оглядах Sauer & Eikmanns [54] та Sonenshein [55]). Явище катаболітної репресії було вивчено досить докладно. Незважаючи на те, що основний катаболітний репресор CsrA був визначений, процес ще далеко не повністю розгаданий (функція більшості генів, що зберігаються в синтезі з *crh*, ще не зрозуміла). Потрібно також зазначити, що деякі гени, що беруть участь у метаболізмі вуглецю, є важливими з несподіваних причин. Це стосується *eno*, *fbaA*, *pgm*, *tkt* і *tpi* в основному гліколітичному шляху і *odhAB*, кодуючи, наприклад, кетоглутаратдегідрогеназу. Цікаво, що аналіз коеволюції генів РНК-ази говорить про існування деградосоми у *B.subtilis*, яка була б функціонально

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

пов'язана з основним гліколітичним шляхом (коеволюція з *trp* та *eno* зокрема) [56].

Азотний обмін. Найкращим джерелом азоту для *B.subtilis* є глютамін. Було спостережено, що бактерії, вирощені в мінімальному середовищі з амонієм як джерелом азоту, ростуть повільно і швидко вироджуються. Штам *B.subtilis* 168 може адаптуватися до швидкого росту з амонієм або глютаментом шляхом оборотної спонтанної дуплікації або делеції послідовності 9 bp в альтернативному гені глютамаатдегідрогенази, *gudB*. Нітрат також може використовуватися як джерело азоту, оскільки *B.subtilis* має як респіраторну, так і асиміляторну нітрат-редуктазу. В організмі існує кілька рятувальних шляхів для пуринів та піримідинів, включаючи рятування багатих на енергію нуклеотидів [56]. Аденіндезаміназа AdeC має активність, продемонстровану на шляху «рятування» пурину. Паралог *uerA* може бути відсутньою дигідропіримідиназою. Він також необхідний для очищення похідних s-аденозилметіоніну (AdoMet). Існує ще один зв'язок між азотом (через аргінін та поліаміни) та метаболізмом сірки. Крім того, цистеїн захищає ArgG від реакційноздатних видів кисню (ROS), тим самим призводячи до дерепресії аргініну в умовах надлишкової продукції цистеїну або ROS. У синтезі діамінопімелату існує вимога перетворення N-ацетил-2,6-діамінопімелату в ацетамідо-6-оксогептаноат. Оскільки ця реакція належить до несуттєвих реакцій у *B.subtilis*, мабуть, є кілька генів, які кодують білки, що проявляють цю ферментативну активність. Трансаміназа PatA може бути кандидатом на цю діяльність, оскільки вона розташована в області, що кодує діяльність, що бере участь у хіміотаксисі, споруляції та контролі синтезу клітинної оболонки. Інші ферменти, такі як SpsC або NtdA, можуть також виявляти деякі з відсутніх активностей. Особливу увагу слід приділити N-ацетилорнітин-амінотрансферазі (EC 2.6.1.11), кодованому геном *argD*. Цей ген потребує кращої характеристики його ферментної активності, оскільки він може проявляти дві пов'язані функції, що включають як метаболізм аргініну, так і метаболізм діамінопімелінової кислоти [53].

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

Обмін сірки. Особливості метаболізму сірки, встановлені з послідовності *B.subtilis*, були описані в оглядовій статті [57]. Хоча синтез цистеїну та метіоніну є досить стандартним для грампозитивного організму, зворотний шлях транссульфурації, що дозволяє рости метіоніну, ще незвичний і ще не повністю зрозумілий. Врятування метіоніну є результатом переробки катаболітів AdoMet та переробки початкових білків, де другий залишок невеликий, за допомогою двох метіонінових амінопептидаз, MarA та MarB. AdoMet в основному використовується для перенесення метильних груп (52 метилтрансферази) і призводить до отримання S-аденозилгомоцистеїну, який надалі метаболізується MtnN у S-рибосілгомоцистеїн та аденін. AdoMet використовується як попередник поліаміну після декарбоксилювання, отримуючи метилтіoadенозин, який рециркулюється за допомогою метилтіорібози (MTR) повним способом спасіння метіоніну, де атоми вуглецю метіоніну походять із фрагмента рибози, а не з проміжних проміжних циклів трикарбонової кислоти. AdoMet використовується для отримання квеозину, складної модифікованої бази поблизу антикодону декількох тРНК (ген *yqeE*). Він також використовується як радикал у кількох реакціях, кодованих генами *bioB*, *hemN*, *hemZ*, *kamA*, *moaA*, можливо *skfB*, *splB*, можливо *uscL* для мембранного білка, *yfkA* (злитий з *yfkA* та *yfkB* в послідовності 1997 р.), *YloN*, *ymcB*, *yutB* (*lipA*), можливо, *yuzB* та *yudG*. Отриманий продукт реакції, 59-дезоксиаденозин, можливо, може бути перероблений шляхом врятування MTR [53].

Прогнозовано гени, що беруть участь в утворенні залізо-сірчаних скупчень [57], деякі з них були виявлені експериментально [58]. Аналіз геному передбачає кілька генів, які беруть участь у процесі побудови кластерів залізо-сірки: *nifS*, *yutI*, *iscU* (*yurV*), *sufC* (*yurY*), а можливо, *ygaC* і *yneR* [53].

Відповідно до свого сапрофітного способу життя, секретом *B.licheniformis* кодує численні ферменти-секрети, які гідролізують полісахариди, білки, ліпіди та інші поживні речовини. Целюлоза -

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

найпоширеніший полісахарид на Землі, а мікроорганізми, які гідролізують целюлозу, сприяють світовому циклу вуглецю. Цікаво, що два генні кластери, що беруть участь у деградації та утилізації целюлози, були виявлені у *B.licheniformis*, і у *B.subtilis* 168 не мають жодних аналогів. Ферменти, кодовані першим генним кластером, включають дві ймовірні ендоглюканази, що належать до сімейства глікозид-гідролази GH9 та GH5, вірогідна целюлоза-1,4- β -целобіозидаза сімейства GH48 та ймовірна β -маннаназа сімейства GH5. В-маннаназа (GH5) та ендоглюканаза (GH9) обидві містять мотиви, що зв'язують вуглеводи. За винятком целюлози-1,4- β -целобіозидази (GH48), усі генні продукти, кодовані в цьому кластері, мають секреторні сигнальні пептиди, і всі вони мають гомологи у видів *Bacillus*, крім *B.subtilis*. Здається, загальний вміст G+C у цьому кластері (48%) помітно не відрізняється від вмісту середнього генома (46%). Другий генний кластер кодує передбачувану β -глюкозидазу (GH1) та три компоненти транспортного комплексу, специфічного для целобіози. Другий ген β -глюкозидази (GH3) присутній у незв'язаному локусі геному. У сукупності гени цих двох кластерів повинні давати можливість *B.licheniformis* використовувати целюлозу як джерело вуглецю та енергії, перетворюючи її в целобіозу та в кінцевому рахунку на глюкозу. У зв'язку з цим було підтверджено, що *B.licheniformis* ATCC 14580 здатний рости на карбоксиметилцелюлозі як єдиному джерелі вуглецю. Хромосома *B.licheniformis* ATCC 14580 кодує ряд додаткових активностей вуглеводів, які можуть дозволити організму рости на широкому спектрі полісахаридів. До них відносяться ксиланаза, ендоарабіназа та пектатна ліаза, які можуть брати участь у деградації геміцелюлози, α -амілази та α -глюкозидази для гідролізу крохмалю, хітинази для розщеплення хітоолігосахаридів від грибів та комах та леванази для використання β -D-фруктани (левани) [52,59].

Сапрофітні організми повинні використовувати різноманітні азотисті сполуки як поживні речовини для росту та обміну речовин. На основі інформації, кодованої в його геномі, *B.licheniformis* ATCC 14580 має

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

здатність здобувати азот із екзогенних білків, пептидів, амінокислот, аміаку, нітратів та нітритів. Як і *B.subtilis*, репертуар позаклітинних протеаз, що виробляються *B.licheniformis*, включає серинові протеази (aprE, epr, vpr), металопротеази (mpr) та асортимент ендо- та екзопептидаз (yjbG, ydiC, gcr, ykvY, ampS, bpr (дві копії), yfxM, yuiE, yusX, ywaD, pepT). Однак *B.licheniformis* також має здатність продукувати ряд додаткових протеаз та пептидаз, які не кодуються в геномі *B.subtilis*. До них відносяться клострипаїноподібна протеаза, цинк-металопептидаза, ймовірна глютамілова ендопептидаза, гомолог амінопептидази C, дві ймовірні дипептидази та цинк-карбоксипептидаза. *B.licheniformis* також має можливість використовувати аміно- та іміно-азот з аргініну, аспарагіну та глютаміну за допомогою активності аргініну демінази, аргінази, аспарагінази та глютамінази. Цікаво, що існує два гени для аргінази, аспарагінази та глютамінази. Імовірно, активність дегімінази аргініну виражається під час анаеробного росту аргініну, тоді як активність аргінази переважає під час аеробного росту. Поява ймовірних генів аргінази є дещо загадкою у *B.licheniformis*, оскільки не існує генів, що кодують активність уреаз для гідролізу сечовини, що генерується реакцією аргінази. Крім відсутності гомологів генів уреаз (ureABC) у *B.licheniformis*, також не вистачає транспортерів глютамінових ABC (glnH, glnM, glnP, glnQ) [52].

Шляхи асиміляції азоту та транспорту можуть бути узгоджені аналогічно у *B.licheniformis* та *B.subtilis* завдяки наявності ключових генів, таких як glnA, glnR, tnrA та prgA в обох видів. Аналогічно, шляхи транспортування нітратів / нітритів у *B.licheniformis* виявляються аналогічними відповідним шляхам у *B.subtilis*, як це запропоновано наявністю nasABC (транспортування нітратів), narGHIJ (респіратата нітратів респіратора) та nasDEF (НАДН-залежна нітритна редуктаза) гени. На відміну від *B.subtilis*, *B.licheniformis* очевидно володіє здатністю до анаеробного дихання за допомогою редуктази оксиду азоту. Більше того, ген, що кодує цю активність, лежить у кластері, що включає кодуючу послідовність для

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

narK (екструзійний білок нітритів), два ймовірні білки fnr (транскрипційні регулятори анаеробного росту) та генний продукт, схожий на dnrN (регулятор, що залежить від оксиду азоту). Деякі ізоляти *B.licheniformis* здатні до денітрифікації [52, 60]. Хоча денітрифікація є процесом великого екологічного значення, внесок *B.licheniformis* може бути невеликим, оскільки вид існує переважно як ендоспори у ґрунті [61].

У бацил біосинтетичний шлях дипіколінової кислоти добре охарактеризований [62]. У *B.subtilis* синтетичний шлях дипіколінової кислоти кодується чотирма оперонами: *dapG*, *asd*, *dapA* та *dpaAB* (*spoVFAB*). Аспаратат-кіназа, кодована *dapG*, відповідає за перший етап каскаду біосинтезу, продукуючи L-4-аспартилфосфат з L-аспартату. Аспартат-семіальдегіддегідрогеназа, кодована *asd*, відповідає за другий етап, продукуючи L-аспартат-4-полуальдегід. Дигідродіпіколінатна синтаза, кодована *dapA* відповідальний за третій етап, продукує L-2,3-дигідродіпіколінат [63]. Синтаза дипіколінової кислоти, яка відповідає за її продукцію, кодується *dpaAB* (*spoVFAB*). Субодиниця дипіколінат-синтази А (*dpaA* або *spoVFA*) кодує передбачувану дегідрогеназу, а субодиниця В дипіколінат-синтази В (*dpaB* або *spoVFB*) є флавопротеїном.

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

Нижче наведено критерії для вибору максимально ефективних і якісних пробіотичних штамів, які допоможуть при виборі і характеристиці необхідних мутацій для отримання високоефективних продуцентів [64]: «

1. Активне вибіркове пригнічення росту патогенних культур мікроорганізмів.

Штами в складі комплексних біопрепаратів повинні випробуватись на симбіотичність з визначенням характеру бактеріоциноспосередкованих конкурентних взаємодій між ними *in vitro* та *in vivo* і характеризуватися

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

взаємодоповнюючим спектром антагоністичної дії щодо широкого ряду патогенних мікроорганізмів.

2. Цитоадгезивні властивості та колонізуюча здатність.

3. Висока стійкість до несприятливих умов зовнішнього середовища. Вважається, що дані щодо стійкості пробіотичних штамів до жовчі, фенолу, шлункового соку, протеолітичних ферментів, лізоциму, хлориду натрію та спроможність розвиватись в умовах високих значень рН опосередковано свідчать про здатність штамів приживлюватись у кишківнику.

4. Висока синтетична активність, зокрема продукція антимікробних речовин, холестеринемічна активність.

5. Нешкідливість для макроорганізму і аутомікрофлори в цілому.

Нешкідливість потенційного продуценту включає: генетичну віддаленість від патогенних бактерій, відсутність жодного фактора патогенності (вірулентності, токсичності, токсигенності), відсутність вираженої здатності до транслокації з кишечника у внутрішні органи, неінвазивність.

6. Стимуляція (модуляція) специфічних та неспецифічних механізмів резистентності макроорганізму.

7. Антибіотикостійкість.

8. Генетична стабільність.

9. Технологічність - висока швидкість росту, використання для життєдіяльності дешевих нехарчових субстратів, стійкість до забруднення сторонньою мікрофлорою; збереження властивостей під час виробництва і в готовому препараті.

10. Походження продуценту пробіотику.»

Серед усіх критеріїв для вибору необхідних мутацій у цьому проекті фокус буде на високу синтетичну активність, зокрема продукція дипіколінової кислоти; антибіотикостійкість та технологічність.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						43
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.2.1. Використання природного та штучного добору

Природний добір - виживання та переважне розмноження найбільш пристосованих до умов навколишнього середовища живих організмів.

Для створення даних штамів було використано штучний добір. Нові штами бактерій *Bacillus subtilis* 3/Re і *Bacillus licheniformis* 31/Re отримані шляхом багаторазового пересіву штамів *B.subtilis* 3 і *B.licheniformis* 31 через живильний агар зі зростаючою концентрацією антибіотиків. Штами бактерій *Bacillus subtilis* 3/Re і *Bacillus licheniformis* 31/Re депоновані в колекції Державного науково-дослідного інституту стандартизації та контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.І. Тарасевича під номерами ГКПМ 263 та ГКПМ 264 відповідно [22].

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

Для створення різних штамів *B.subtilis* використовували ультрафіолетове випромінювання певної довжини хвиль (150-250 нм), оскільки більшість спор цих бактерій є стійкими до більшості довжин хвиль випромінювання. Нижче наведено приклад проведеного експерименту для отримання нових мутантних штамів бактерій даного виду з використанням УФ-випромінювання.

Зразок для опромінення. Основний розчин спор зберігали у вигляді суспензії у воді при 10^{10} КУО на мл при 4°C. Суспензію розбавляють у воді до 10^8 КУО на мл перед використанням, і розчинник був поміщений на мембранний фільтр (Millipore, GSWP02500, розмір пор = 0,22 мкм). Щоб відрегулювати центр фільтра, його накрили аркушем паперу з хрестоподібним вирізом, шириною 5 мм. Фільтри поміщали в 12-місцевий колекторний апарат (Millipore) під слабким вакуумом та 10 мкл суспензії, в якій міститься 10^6 КУО, було помічено в центрі кожного фільтра. Після висихання на повітрі спори можна було виявити як слабо рефрактерне поширення в колі діаметром близько 3 мм. Ці фільтри зберігали у коробці та використовували протягом одного-двох днів [65].

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						44
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Процедура опромінення. Зразки на фільтрах були прикріплені до металевого тримача (камера має шестикутну рамку для вставки шести тримачів). Контрольні зразки можна було розмістити в камері поза світловою доріжкою. Неодноразові експерименти показали, що спори, які утримувались протягом декількох годин у камері, випорожненій при тиску нижче 10^{-5} торр, не виявляли жодних подальших втрат у здатності утворювати колонії, а також жодного збільшення частоти мутацій. Позиції зразків були відрегульовані в центрі прямокутної світлової області (5 мм x 10 мм) так, щоб вся пляма зразка була викрита. Струм пучка під час опромінення контролювався постійно. Час витримки визначали з урахуванням інтенсивності, струму пучка під час опромінення та очікуваної ефективності випромінювання. Час витримки змінювався від 5 с до 1200 с залежно від типу спор та довжини хвилі. Монохроматор та камера були випорожнені при тиску нижче $2 \cdot 10^{-5}$ торр до початку експозиції. Зразок можна змінити, повернувши ручку, з'єднану з рамою з тримачами для зразків: експозицію розпочали або припинили вручну за допомогою стулки на вході в камеру [65].

Спори *Bacillus subtilis* піддавалися у вакуумі монохроматичному УФ-випромінюванню від синхротронного випромінювання в діапазоні довжин хвиль від 150 нм до 250 нм. Виживання та частота мутації до незалежної від гістидину реверсії були проаналізовані на три типи спор, що відрізняються можливостями відновлення ДНК. Спори, що резистентні до ультрафіолетового випромінювання (здатність до відновлення ДНК дикого типу) виявляли майже однакову чутливість до летальних впливів дальнього УФ (220 нм і 250 нм) та вакуум-УФ-випромінювання (150 і 165 нм), але виявляли помітну стійкість до випромінювання 190 нм.. Спори, що чутливі до ультрафіолетового випромінювання (дефіцит виправлення та відновлення спор) та УФ-потентні спори (дефектна похідна ДНК-полімерази УВС) демонстрували подібні спектри дії; виражена чутливість при 250 і 220 нм, нечутливість при 190 нм і поступове збільшення чутливості в міру

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

зменшення довжини хвилі до 165 нм. У всіх штаммах спектри дії для індукції мутації були паралельними спектрам інактивації, вказуючи на те, що вакуум-УФ-випромінювання спричиняло смертельні та мутагенні пошкодження спорової ДНК. Нечутливість спор до довжин хвиль близько 190 нм може бути пояснена, якщо припустити, що випромінювання поглинається матеріалами, оточуючими серцевину, в якій знаходиться ДНК [65].

3.2.3. Використання методів генної та клітинної інженерії.

Bacillus subtilis широко використовується для біотехнологічного виробництва, але метаболізм у стаціонарній фазі досі не досліджено докладно. Було досліджено метаболізм *B.subtilis* та продукування дипіколінової кислоти. Було виявлено, що продукування дипіколінової кислоти конкурує з синтезом ацетоїну і що делеція генів синтезу ацетоїну (alsSD) збільшує продуктивність дипіколінової кислоти в 1,4 рази. Мутант показав цікаві особливості: поглинання глюкози пригнічувалося, тоді як щільність клітин зросла приблизно на 50%, що призводило до аналогічного більшого споживання глюкози, ніж у батьківського штаму. Метаболічні профілі виявляли накопичення пірувату, ацетил-КоА та проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот в мутанті alsSD. Результати досліджень свідчать про те, що *B.subtilis* з видаленням alsSD, має потенціал як ефективний хазяїн для стаціонарної фази виробництва сполук, синтезованих з цих проміжних продуктів [66].

Геном дикого типу штаму *B.subtilis* 168 містить 2 профаги (SP β і PBSX) та 7 профагоподібних областей (pro1 до pro7), які піддають клітини ризику лізису шляхом індукції профагів при пошкодженні клітин господаря, та гени, що кодують синтез пліпастаніну та бациллаена (pps та rks відповідно), що можуть знизити життєздатність під час тривалої життєдіяльності культури. Таким чином, у дослідженні, що описується був використаний штам без профагів та антибіотиків, OA105. Мутант з делецією у alsSD OA105- Δ alsSD був сконструйований методом без маркерних порушень. Порушення в OA105

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

та OA105-ΔalsSD були підтверджені методом ПЛР та секвенуванням ДНК [66].

Для побудови штамів, що продукують дипіколінову кислоту, нативний промотор spoVFA був замінений промотором spoVG у штамх OA105 та OA105-alsSD відповідно до методів Такаhashі, що наведено нижче [63]:

1. Генетичні процедури: стандартні процедури застосовували для отримання плазмідних препаратів, поглинання ферментів рестрикції, лігування, трансформації та електрофорезу агарозного гелю. *B.subtilis* трансформували методом природної компетентності до трансформації. Хромосомні інтеграції та делеції підтверджували за допомогою відповідного антибіотичного маркера, аналізу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та дослідження продуктів бродіння.

2. Хромосомна вставка ДНК, що кодує промотор egl-237 або spoVG, у промотор spoVFA: Експресія синтази дипіколінової кислоти (SpoVFAB) у вегетативних клітинах досягалася шляхом вставки резистентної до хлорамфеніколу касети та промотору egl-237 або промотору spoVG у нижній області промотору spoVFA. Специфічні праймери були розроблені для ампліфікації ДНК промотору, що кодує spoVFA, верхньої частини структурного гена spoVFA, касети, стійкої до хлорамфеніколу, промотору egl-237 або промотору spoVG. Касету, стійку до хлорамфеніколу, ампліфікували з вектора pC194 за допомогою праймерів Cat F і Cm RV; промотор egl-237 ампліфікували з вектора pHA237 з використанням праймерів Cm/P237 FW і P237/spoVFA RV; і промотор spoVFA, верхню частину структурного гена spoVFA та промотор spoVG ампліфікували з ДНК геному *B.subtilis* 168, використовуючи набори праймерів Cm/PspoVG FW і PspoVG/spoVFA RV, PsVFA FW і PsVFA/Cm RV, або spoVFA FW і spoVFA RV відповідно. Фрагмент гена, що об'єднує, в порядку промотору spoVFA, резистентної до хлорамфеніколу касети, промотору egl-237 або промотору spoVG та верхньої частини структурного гена spoVFA, був виготовлений шляхом одношагового розширення ПЛР з перекриттям (OE-PCR) з

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

використанням вкладених праймерів PsVFA FW2 та spoVFA RV2. Ці сконструйовані ДНК вставляли в промоторну область spoVFA у геном *B.subtilis* 168, використовуючи метод природних компетентностей для трансформації. Об'єднані продукти змішували з компетентними клітинами *B.subtilis* 168 і отримані трансформанти відбирали на планшетах з агаром LB, що містять 10 мг/л хлорамфеніколу. Позитивні трансформанти були підтверджені за допомогою ПЛР за допомогою праймерів Cm/PspoVG FW і PsVFA/Cm RV з подальшим електрофорезом агарозного гелю [63].

Касету резистентності до хлорамфеніколу ампліфікували із шаблону плазміді pDLT3 з використанням праймерів CmF2 та CmR2. Послідовність промотору spoVG ампліфікували за допомогою праймерів spoVGpro-F та spoVGpro-R, а послідовність верхньої та нижньої області промотору spoVFA ампліфікували за допомогою наборів праймерів spoVFA-F1 і spoVFA-R1, і spoVFA-F2 і spoVFA-R2 відповідно. Ці фрагменти були з'єднані за допомогою ПЛР перекриваючогося розширення (OE-PCR). Такий вид ПЛР використовується для вставки специфічних мутацій у певних точках послідовності або для злиття менших фрагментів ДНК у більший полінуклеотид. Штам OA105 та OA105-ΔalsSD трансформували з лігативним продуктом, і отримані трансформанти отримали позначення OA105-DPA та OA105ΔalsSD-DPA відповідно. Фрагментні вставки перевіряли за допомогою ПЛР, а вставлені ділянки підтверджували секвенуванням ДНК. KOD plus Neo (Toyobo) була використана як полімераза для всіх ПЛР [66].

3.3. Схема отримання продуцентів, що використовуються в роботі

Для даної технології буде запропоновано спосіб отримання промислових продуцентів селективним методом штучного добору. У разі необхідності удосконалення технології може бути запропоновано спосіб отримання промислових продуцентів з підвищеним синтезом дипіколінової кислоти, що описаний вище.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

Отримання промислових штамів за схемою описаною нижче буде відбуватися із штамів *Bacillus subtilis* 3 (УКМ В-5007) та *Bacillus licheniformis* 31 (УКМ В-5514)..

При отриманні продуцентів *Bacillus subtilis* 3/Re та *Bacillus licheniformis* 31/Re у виробництві пробіотичного препарату «Біоспорин» використовують такі основні стадії:

1. Виділення штаму з асоціативної культури за допомогою елективного середовища. Штам *Bacillus subtilis* 3 (УКМ В-5007) та *Bacillus licheniformis* 31 (УКМ В-5514) отримані та зберігаються в Українській колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України [67]

2. Підготовка штаму до селекційної роботи.

У даній стадії є декілька підпунктів:

1) дослідження природньої мінливості за морфологічними та кількісними ознаками;

2) очистка культури:

➤ розсів вихідного штаму на чашки Петрі (не менше 100 колоній) та оцінювання їх за морфологічними ознаками;

➤ оцінювання отриманих клонів за рівнем продукування біомаси;

➤ відбір 1 клону, що відрізняється високим та відтворюваним рівнем продукування біомаси;

3) стабілізація культури:

➤ розсів відібраного клону (100 колоній), оцінювання колоній за морфологією та рівнем продукування біомаси;

➤ побудова варіаційного ряду та розрахунок статистичних показників (середнє арифметичне, середнє квадратичне відхилення, коефіцієнт варіації) для отриманих колоній;

➤ повторне оцінювання клонів з підвищеним рівнем продукування, відбір найпродуктивнішого субклону, його розсів та оцінювання;

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						49
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

➤ порівняння двох варіаційних рядів та вибір найпродуктивнішого субклубу [68].

Підготовка штамів роду *Bacillus* до селекційної роботи включає приготування суспензії культури за стандартом каламутності та визначення її титру або КУО, тобто концентрації бактеріальних клітин у ній. Оскільки підготовлена таким чином культура має приблизну концентрацію бактерій, то для визначення її точнішої концентрації буде використано – нефелометричний або турбідиметричний методи. В нефелометричному і турбідиметричному методах використовуються явища розсіювання або поглинання світла клітинами, що знаходяться в рідкій фазі в завислому стані. Концентрація клітин бактерій повинна бути $1 \cdot 10^9$ КУО/см³.

1) Дослідження природньої мінливості за морфологічними та кількісними ознаками.

Антагоністичну активність штамів пробіотиків щодо клінічних умовно-патогенних штамів визначають методом відстроченого антагонізму (ФС 42-347698), антагоністичну активність вважають нульовою при зоні затримки росту тест-штаму до 5 мм, нижчою від 5 до 10 мм, середньої від 10 до 15 мм, високою від 15 до 20 мм, дуже високою вище 20 мм.

Для оцінки стійкості бактерій до дії біологічних рідин ШКТ бактерії інкубують при 37 °С протягом двох годин з шлунковим соком або жовчу. У пробірку з 1 мл бактеріальної суспензії додають 9 мл біологічної рідини з подальшим визначенням кількості життєздатних клітин методом серійних розведень з висівом на середу Гаузе №2.

Адгезивні властивості бактерій вивчають на:

- формалінізованих еритроцитах людини, ступінь адгезивності вважають нульовою при СПА від 0 до 0,99; низькою - від 1,00 до 1,99; середньої - від 2,00 до 3,99 і високою > 4,00;
- епітеліоцитах піхви;
- епітеліальних клітинах кишківника щурів і мишей, рівень адгезії окремих штамів бактерій умовно диференціювали на чотири ступені:

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						50
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

неадгезивності (СПА = 0); слабоадгезивних (СПА = 1-5); середньоадгезивну (СПА = 5-10); високоадгезивні (СПА вище 10) [69].

Резистентність бацил до дії антибіотиків встановлюється методом дифузії в агар на середовищі Mueller-Hinton у відповідності з методиками, рекомендованими NCCLS за допомогою стандартних дисків фірми BBL.

Антибактеріальну здатність лактобактерій можливо виявити 3 методами: методом перпендикулярних штрихів (прямого антагонізму) на спеціальному поживному середовищі – середовище Лурія-Бертані, методом сумісного культивування на поверхні твердого поживного середовища та методом відстроченого антагонізму (по методу Грація). В даній технології пропонується використовувати метод перпендикулярних штрихів [70].

Визначення активності кислотоутворення антагоністично активних штамів бацил проводять титрометричним методом та виражають в градусах Тернера.

Оцінку персистентності пробіотичних штамів бацил в шлунково-кишковому тракті проводять на мишах лінії "black". Мишам одноразово перорально вводять досліджувані культури в дозі 1×10^9 КУО / 0,5 мл. Свіжий кал зважують і гомогенізують в фізіологічному розчині (ФР). Потім послідовні десятикратні розведення висівають на щільне середовище Гаузе №2. Посіви інкубують при температурі 37 °C протягом 48 год. Колонії, що вирости ідентифікують за морфологічними і біохімічними ознаками [69].

2) Очистка культури.

Вихідний штам висівають на чашки Петрі. Серед не менше ніж 100 колоній виявляють типову для даної культури форму та відхилення від неї. Далі колонії ізолюють на скошене агаризоване середовище. Ізольовані колонії (клони) як типової форми (не менше 100), так і доступне число її морфологічних варіантів оцінюють за рівнем морфології культури.

Декілька клонів з найбільш високим показниками продукування біомаси порівняно з рівнем контролю, яким являється вихідна культура, відбирають та перевіряють на продукцію в декількох повторюваностях, а

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

потім відбирають один клон, що відрізняється високим та відтворюваним рівнем біомаси. Ця процедура призводить до відбору клона з найоптимальнішими ознаками.

Відібраний з розсіву вихідної культури клон пересівають і відмічають морфологічну мінливість [68,71].

3) Стабілізація культури.

Отриманий на попередньому етапі клон знов розсівають на близько 100 субклонів, досліджують його морфологічну мінливість (якщо вона є) та рівень продукування.

Отримані дані розподіляють у варіаційний ряд та обробляють за допомогою статистичних методів: середнє арифметичне, середнє квадратичне відхилення та коефіцієнт мінливості. Субклони, що потрапили в крайню праву частину цього ряду, відбирають та повторно оцінюють. Якщо в другій вибірці спостерігається тенденція до зниження необхідних параметрів мікроорганізму, то проводять ще один етап клонування, вибравши з цього ряду найкращий клон, та будують третій варіаційний ряд і порівнюють їх коефіцієнти мінливості. Ця операція проводиться до тих пір, поки коефіцієнти мінливості досліджуваних виборок не будуть відрізнятися більше ніж на 5%.

Метою такого ступінчастого клонування є стабілізація вихідної культури за кількісною ознакою, отримання найбільш однорідної за даною ознакою популяції [68,71].

3. Отримання нових штамів.

При штучній селекції ставиться задача змінити характеристику культури, що спрямовано на підвищення пробіотичних властивостей продуценту та підвищення антибіотикорезистентності.

Згідно з даних патенту наведено метод отримання нових штамів. Штами бактерій *Bacillus subtilis* 3/Re і *Bacillus licheniformis* 31/Re отримані шляхом багаторазового пересіву штамів *B.subtilis* 3 і *B.licheniformis* 31 через живильний агар зі зростаючою концентрацією антибіотиків: ампіциліну,

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

метициліну, оксациліну, бензилпеніциліну, моксалактаму, цефоперазону, цефотаксиму, моксалактаму, цефтазидиму, цефтізоксиму, цефуроксиму, цефтріаксону, ваккоміцину, кліндаміцину, піперациліну, моксалактаму, поліміксину Е, хлорамфенікону і азтреонаму [22].

4. Відбір клітин з бажаними властивостями.

Суспензії, що залишились після обробки антибіотиками розводяться і висіваються на поживне середовище МРС. На цьому етапі практично визначається відсоток виживання. Після отримання моноколоній аналізується кожна клітина окремо. Визначається індекс активності після проведення селекційного відбору і порівнюється з індексом активності та показниками антибіотикорезистентності музейної культури. Відбираються найкращі варіанти щодо індексу активності та антибіотикорезистентності.

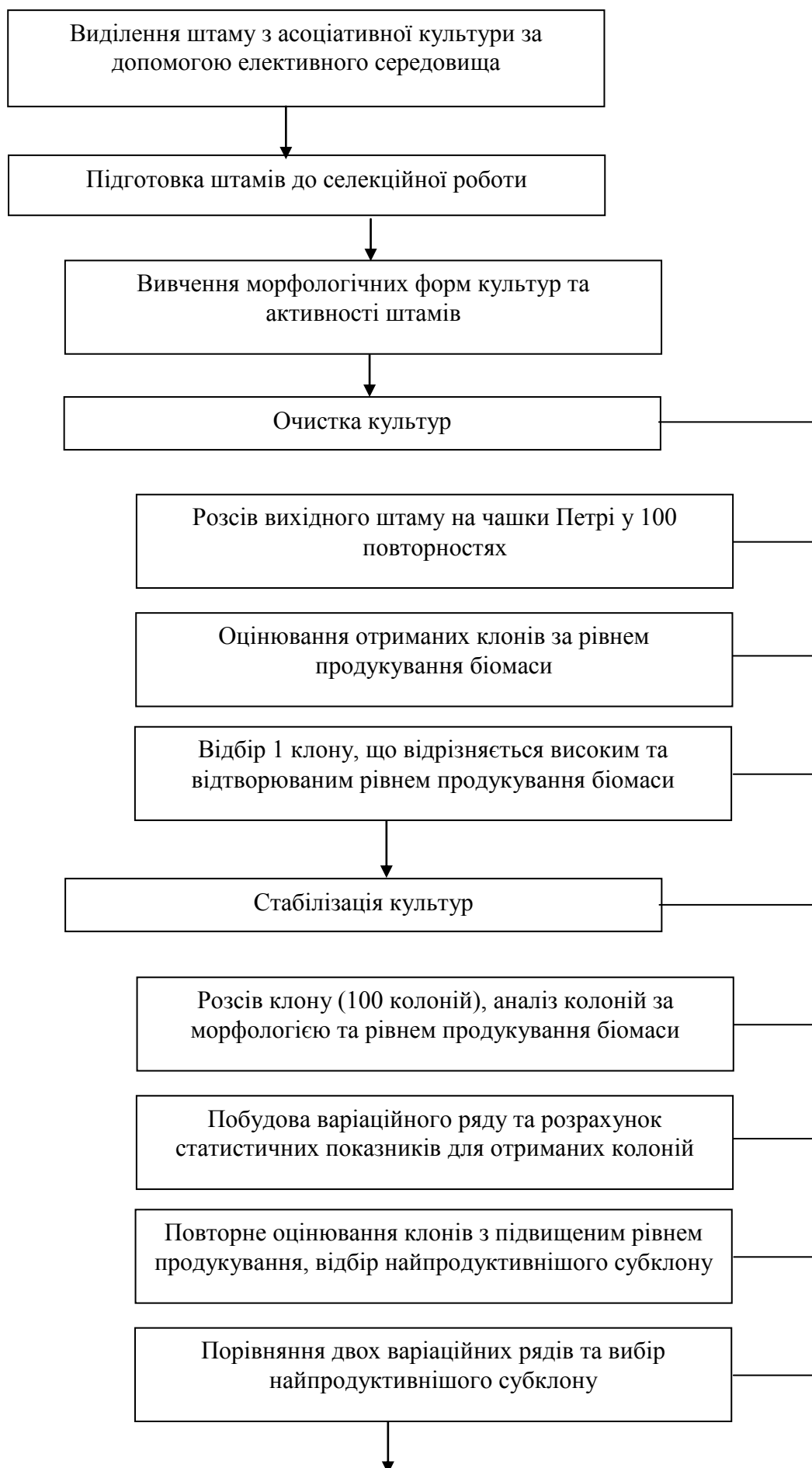
5. Стабілізація штаму.

Відібрані клони кожного з штамів пересівають і стабілізують для отримання однорідної популяції. Процес проводять аналогічно як у пункті 1.3.

6. Отримання промислового продуценту

Блок-схема отримання промислових продуцентів для виробництва Біоспорину наведена на рис. 3.3.1.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		53



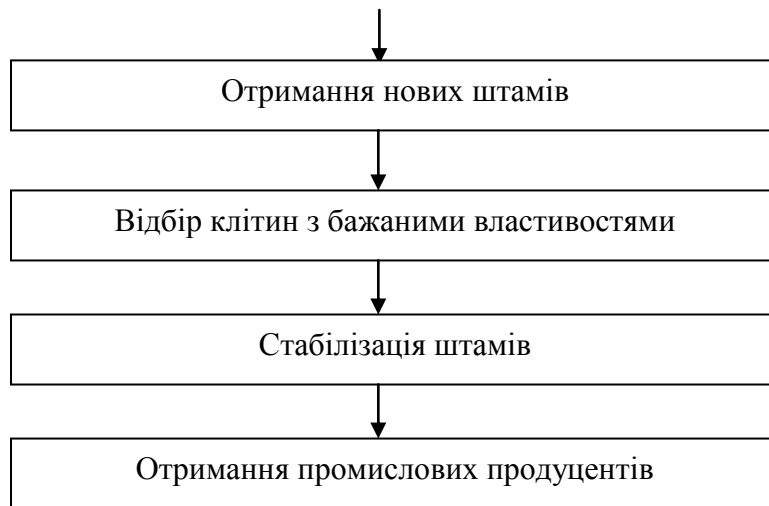


Рис. 3.3.1 Схема отримання продуцентів для виробництва препарату «Біоспорин».

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції: Біоспорин.

НТД: ТУ У 10.8-36273281-002:2013 на ТОВ «ФЗ «БІОФАРМА».

Призначення продукції та можливі галузі використання. Біоспорин – це пробіотичний біотерапевтичний препарат, що являє собою ліофілізовану біомасу двох штамів транзиторної мікрофлори *B.subtilis* 3/Re та *B.licheniformis* 31/Re. Препарат застосовується для лікування дорослих і дітей з гострими кишковими інфекціями та хронічними захворюваннями органів травлення, ускладнених дисбактеріозами.

Біоспорин створює умови для відновлення індивідуальної фізіологічної мікрофлори кишківника за рахунок елімінації внаслідок антагоністичної активності патогенних та умовно-патогенних бактерій, грибової флори, також позитивного впливу на стан загального та місцевого імунітету, цитопротекторних властивостей слизового бар'єру кишківника. Препарат сприяє нормалізації якісного та кількісного складу індивідуальної фізіологічної мікробіоти кишківника здорової людини.

Зовнішній вигляд та фізико-хімічні характеристики. Препарат являє собою пористу масу від світло-сірого до бежевого або темно-сірого кольору, можливо зі світло або темно-коричневим відтінками, специфічного запаху, солодкого смаку.

Склад на один флакон: спори і живі мікробні клітини: *Bacillus subtilis* 3/Re - не менше $10 \cdot 10^9$ КУО, *Bacillus licheniformis* 31/Re не менше $1,6 \cdot 10^9$ КУО; допоміжні речовини – сахароза та желатин.

Умови зберігання. Препарат зберігати у оригінальній упаковці у сухих, захищених від світла приміщеннях з температурою не вище +25 °С.

					ДП 6221 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Щердина В.Ю.			РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	56
						Аркушів	
						120	
Керівник		Ялобенко О.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.						ФБТ	

Термін зберігання. 2 роки.

Вимоги щодо транспортування, упаковки та маркування.

Транспортують згідно з СТ-Н МОЗУ 42-5.1:2011.

Упаковка. Порошок або пориста маса для приготування розчину у пластикових флаконах. По 10 флаконів в упаковці.

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Показники, що контролюють вимоги до якості сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються при виробництві Біоспорину, наведено у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів.

1	2	3	4
Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1. Основна сировина:			
1.1. Вода питна	ДСТУ 7525:2014	Мікробіологічна чистота згідно ДСТУ 7525:2014, рН 6,5-8,5; жорсткість загальна, не більше 7 моль/дм ³	Для приготування поживного середовища, робочого розчину гідроксиду натрію, захисного середовища, ополіскування
1.2. Гідролізат казеїну	ТУ У 24.4-37219230-001:2011 (ТОВ «Фармактив»)	Згідно вимог ТУ У 24.4-37219230-001:2011	Основа поживного середовища
1.3. Магній сульфат 7-водний	ГОСТ 4523-77	Масова частка MgSO ₄ • 7H ₂ O не менше 99,5%	Мікроелементи для поживного середовища
1.4. Кальцій	ГОСТ 450-77	Масова частка	Мікроелементи

1	2	3	4
хлористий		CaCl ₂ не менше 96,5 %	для поживного середовища
1.5.Марганець(II) сірчаноокислий 5-водний	ГОСТ 435-77	Масова частка MnSO ₄ • 5H ₂ O не менше 98,0 %	Мікроелементи для поживного середовища
1.6. Натрій хлористий	ГОСТ 4233-77	Масова частка NaCl не менше 99,9 %	Мікроелементи для поживного середовища
1.7. Залізо (II) сірчаноокисле 7-водне	ГОСТ 4148-78	Масова частка FeSO ₄ • 7H ₂ O не менше 99,0%	Мікроелементи для поживного середовища
1.8. Екстракт кукурудзяний згущений	ГОСТ 18-206-74	Згідно вимог ГОСТ 18-206-74	Основа поживного середовища
1.9. D-Глюкоза	ГОСТ 6038-79	Вологість, вміст кислот, хлоридів, сульфатів, заліза, свинцю, миш'яку	Основа поживного середовища
1.10. Музейна культура штам <i>B.subtilis</i> 3/Re		Морфологія, характерна для даного продуценту, без присутності сторонньої мікрофлори	Музейна культура, для отримання посівного матеріалу
1.11. Музейна культура штам <i>B. licheniformis</i> 31/Re		Морфологія, характерна для даного продуценту, без присутності сторонньої мікрофлори	Музейна культура, для отримання посівного матеріалу
2. Допоміжна сировина:			
2.1. Гідроксид натрію	ГОСТ 2263-79	Масова доля NaOH не менше 45,5%	Для коректування рН
2.2. Вода оборотна	ДСТУ 7525:2014	рН 6,5-8,5; жорсткість загальна, не більше 7 моль/дм ³	Холодоагент, тепло агент
2.3. Олія вазелінова	ГОСТ 3164-78	Згідно ГОСТ 3164-78	Для зберігання музейних культур

1	2	3	4
медична			
2.4. Водню перекис	ГОСТ 177-88	Масова доля перекису 35%-40%	Антисептик для обробки та дезінфекції поверхонь
2.5. Спирт етиловий ректифікаційний	ГОСТ 18300-87	Об'ємна доля етилового спирту, не менше 96,2%	Антисептик для обробки та дезінфекції поверхонь та для горіння факелів
2.6. Брілло	ТУ У 00146137. 024-99	Згідно вимог ТУ У 00146137. 024-99	СМЗ
2.7. Аргон газоподібний	ДСТУ ГОСТ 10157:2019	Згідно вимог ДСТУ ГОСТ 10157:2019	Для закупорки
2.8. АХД 2000	ООО «Лізоформ Медікал»	Згідно технічного регламенту ООО «Лізоформ Медікал»	Для дезінфекції рук персоналу
2.9. Лізоформін	ООО «Лізоформ Медікал»	Згідно технічного регламенту ООО «Лізоформ Медікал»	Для дезінфекції рук персоналу
2.10. М'ясо-пептонний агар	ДП «Біофарма»	Згідно технологічного регламенту ДП «Біофарма»	Для мікробіологічного контролю та відновлення музейних культур
2.11 Середовище Лурія-Бертані (LB)	HiMedia	Згідно технологічного регламенту HiMedia	Для мікробіологічного контролю
3. Матеріали:			
3.1. Картон фільтрувальний для харчових рідин	ГОСТ 12290-80	Маркування; стерильність	Фільтруючий і стерилізуючий матеріал
3.2. Картон пакувальний	ГОСТ 12301-2006	Маркування; цілісність	Пакувальний матеріал
3.3. Флакони пластикові	ТУ У 23455985-	Маркування; цілісність	Для готового продукту

1	2	3	4
	001-97		
3.4. Кришка до флакона пластикового	ТУ 21643937-001-2000	Маркування; цілісність	Для готового продукту
3.5. Папір обгортковий	ГОСТ 8273-75	Згідно вимог ГОСТ 8273-75	Для обгортання колб при стерилізації
3.6. Етикетка внутрішня, (30*20) мм	-	-	Для маркування флаконів
3.7. Комплекти одягу чоловічі та жіночі для чистих приміщень	ТУ У 16293843.007-2000	Згідно вимог ТУ У 16293843.007-2000	Для роботи персоналу
3.8. Халат медичний жіночий	ГОСТ 24760-81	Згідно вимог ГОСТ 24760-81	Для роботи персоналу
3.9. Халат медичний чоловічий	ГОСТ 25194-62	Згідно вимог ГОСТ 25194-62	Для роботи персоналу
4.Напівпродукти:			
4.1. Посівний матеріал <i>B.subtilis</i> 3/Re		Згідно виробничого регламенту	Для засіву ферментера
4.2. Посівний матеріал <i>B.licheniformis</i> 31/Re		Згідно виробничого регламенту	Для засіву ферментера
4.3. Культуральна рідина із захисним середовищем сушіння		Згідно виробничого регламенту	Для приготування висушеного готового продукту

4.3. Опис технологічного процесу

Технологія отримання біотерапевтичного препарату Біоспорин складається з таких принципових стадій: підготовка поживного середовища, приготування захисного середовища для сушіння, підготовка посівного матеріалу, виробниче культивування, заморожування та ліофілізація біомаси. Докладніше дані процеси представлені у графічній частині дипломної роботи

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

на технологічній схемі виробництва Біоспорину шляхом глибинного культивування культур *B.subtilis* 3/Re, *B.licheniformis* 31/Re. Апаратурне оформлення процесів представлено у графічній частині дипломної роботи на апаратурній схемі виробництва Біоспорину.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.

Санітарна підготовка виробництва є блоком робіт та операцій, що забезпечують регламентовану якість препарату на всіх наступних стадіях виробництва. Цей етап включає в себе підготовку персоналу, приготування миючих та дезінфікуючих розчинів, підготовку виробничих приміщень, обладнання і комунікацій, приготування робочих розчинів, підготовку повітря та води. Санітарна підготовка виробництва та технологічний процес проводяться відповідно до вимог GMP, ДСанПіН та чинних нормативних актів в галузі фармацевтичної і біотехнологічної промисловості.

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Підготовка персоналу включає в себе інструктаж з техніки безпеки та санітарну підготовку персоналу.

Належний санітарний стан персоналу забезпечується контролем стану здоров'я при прийомі на роботу, регулярним медичним оглядом, який проводиться не рідше одного разу на рік (згідно відповідних наказів МОЗ України) або за необхідністю, проведенням періодичної диспансеризації персоналу для виявлення хронічних захворювань, дотриманням правил особистої гігієни.

Всі працівники підприємств біотехнологічної промисловості незалежно від характеру роботи, стажу, кваліфікації та досвіду роботи проходять інструктаж з техніки безпеки. Перед початком роботи працівники проходять підготовку, навчання, а також періодично проходять перепідготовку в процесі роботи. Однією з найважливіших вимог, що пред'являється до персоналу є відповідний рівень кваліфікації. Підготовка персоналу включає набуття працівниками базових знань щодо відповідної ділянки виробництва, а також здобуття необхідних навичок для забезпечення належного рівня

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

виробничого процесу. Весь персонал повинен регулярно проходити професійне навчання з дисциплін, пов'язаних з належною виробничою практикою виробництва продукції.

Дотримання вказаних вимог знижує вірогідність випуску бракованої продукції і створення аварійних ситуацій в результаті неправильних дій персоналу.

Контроль мікробної контамінації рук робиться періодично не рідше 2 разів у тиждень та 1 раз на 2 тижня – після обробки рук дезінфекційними розчинами.

Технологічний одяг персоналу, що має контакт з потенційно інфекційними матеріалами, двічі на місяць стерилізують автоклавуванням (2 атм 30 хв) і передають на прання окремо від іншого одягу, ці комплекти одягу використовують тільки в приміщеннях з відповідним статусом. Технологічний одяг персоналу, що не має контакту з потенційно-інфекційними матеріалами, двічі на місяць передають на прання без попередньої стерилізації.

Для обробки рук персоналом використовуються комерційні засоби «Лізоформін» і «АХД».

ДР 1.2. Приготування дезінфікуючих та миючих розчинів

У відповідності до вимог GMP персонал та обладнання повинні пройти відповідну обробку дезінфікуючими розчинами, що дозволяє зменшити ризик контамінації цільового продукту (отримання бракованої продукції).

Приготування дезінфікуючих розчинів, які призначені для обробки приладів та приміщень, здійснюється відповідно до «Методичних рекомендацій щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502.

Приготування дезінфікуючих розчинів здійснюють, дотримуючись засобів особистої безпеки: одягають гумові рукавички, захисні окуляри, марлеву пов'язку.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

Для мийки використовують миючий засіб “Brillo”. Для дезінфекції робочих поверхонь використовується розчин 70% етилового спирту та 6% розчин перекису водню. Термін зберігання приготованих розчинів 5-6 днів. Спороцидна і бактерицидна активність даних розчинів підвищується з підвищенням температури. Використовується для обробки виробничих приміщень та обладнання. Дезінфікуючі розчини після приготування повинні зберігатися обмежений час у спеціальних попередньо вимитих ємностях, у яких передбачено можливість відбору проб для перевірки мікробіологічної чистоти.

Для обробки виробничих приміщень, обладнання та комунікацій готують такі розчини: розчин перекису водню та розчин синтетичного порошкоподібного миючого засобу.

ДР 1.2.1. Приготування розчину перекису водню 6%

Розчин готують шляхом розведення 33%-го розчину перекису водню водою питною у збірнику з перемішуючим пристроєм до утворення 6%-го перекису водню при 40 об/хв, після чого даний дезінфікуючий розчин зберігають у спеціальній ємності (збірнику) протягом визначеного часу (термін зберігання 5-6 діб). Розчин перекису водню 6% використовується на даному виробництві у поєднанні з розчином миючого засобу для обробки виробничих приміщень та обладнання.

ДР 1.2.2. Приготування розчину миючого засобу

Розчин готують для разового використання у збірнику з перемішуючим пристроєм шляхом розчинення визначеної кількості синтетичного порошкоподібного миючого засобу у питній воді при температурі 40-50°C та перемішуванні при 40 об/хв. Отриманий 10% миючий розчин використовується для обробки виробничих приміщень та мийки вузлів обладнання. Термін зберігання даного розчину – 5-6 днів.

ДР 1.2.3. Приготування розчину етилового спирту 70%

Приготування даного розчину регламентоване наказом МОЗ України № 197 від 07.09.93. Змішують 675,0 мл етилового спирту 96% і 325,0 мл води

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

питної. Густина 0,886-0,883 кг/дм³, що відповідає вмісту C₂H₅OH 70-71% (об.). Термін зберігання розчину – 5-6 днів.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

Підготовку виробничих приміщень здійснюють відповідно до «Методичних рекомендацій щодо підготовки виробничих приміщень» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502.

Підготовка виробничих приміщень включає прибирання виробничих приміщень, яке ділять на щоденне і генеральне. Щоденне прибирання проводять після кожної зміни (зазвичай двічі на добу), генеральне - 1 раз на тиждень.

Щоденне прибирання проводиться перед початком роботи. Включає в себе: протирання робочих поверхонь та обладнання 70% розчином етилового спирту. В кінці робочого тижня всі поверхні протирають 6% розчином перекису водню з 0,5% миючим засобом.

Генеральне прибирання проводиться один раз на місяць. Включає в себе: протирання всіх робочих поверхонь і обладнання, включаючи поверхні холодильників, термошаф і т.п. 70% розчином етилового спирту, протирання дверей, ручок, підлоги 6% розчином перекису водню з 0,5% миючим засобом, з розрахунку 100 мл/м³.

Інвентар після проведення робіт знезаражують витримуванням в миючому розчині протягом 3 годин.

Регулярно здійснюють мікробіологічний контроль поверхонь і повітря в виробничому приміщенні.

Допускається не більше 10 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на 2-х чашках Петрі, при засіві змивів зі 100 см² поверхні.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

Підготовку обладнання і комунікацій проводять до і після технологічного процесу. Цей блок робіт включає в себе мийку, обробку дезінфікуючими розчинами обладнання і комунікацій із подальшим ополіскуванням. Обов'язковою є також перевірка на герметичність і

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

справність, а також стерилізація обладнання, коли це можливо. Очищення обладнання входить до блоку робіт зі щоденного догляду обладнання та регламентується відповідними розділами технологічних інструкцій та інструкцій з експлуатації обладнання за встановленими на підприємстві методиками.

ДР 1.4.1. Мийка вузлів обладнання

Обладнання миють теплим розчином синтетичного миючого засобу (температура 40°C). В якості матеріалів для підготовки обладнання використовують поролонові губки, серветки із зачепленими краями з безворсової тканини. Знімальні частини (вузли) обладнання, які безпосередньо торкаються з сировиною або її проміжними продуктами, знімають, розбирають і миють розчинами миючих засобів та водою питною за тієї ж температури. Ополіскування обладнання проводиться водою питною з обов'язковим візуальним контролем якості відмивки. Відпрацьовані розчини та промивні води надходять до стадії знешкодження відходів.

ДР 1.4.2. Дезінфекція обладнання.

Повну дезінфекцію обладнання і комунікацій проводять 1-2 рази в рік розчином перекису водню 6% або іншим дозволеним антисептиком. Для дезінфекції обладнання, його повністю заповнюють розчином антисептика і витримують протягом 1,5-3,0 годин при температурі 55-65°C. Зовні металічні поверхні обробляють етиловим спиртом, не металічні — розчином перекису водню. Знімальні частини обладнання витримують в розчині антисептика при умовах, аналогічних до дезінфекції обладнання. Дезінфекцію комунікацій проводять передавлюванням розчину антисептика з одного апарату в інший. Після обробки антисептиками, обладнання та комунікації промивають декілька разів питною водою, контролюючи якість промивної води. Відпрацьовані розчини та промивні води надходять до стадії знешкодження відходів. Обробку зовнішньої поверхні обладнання проводять аналогічно до підготовки виробничих приміщень.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						65
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Щоденну дезінфекцію обладнання проводять, обробляючи зовнішні поверхні обладнання та комунікацій дезінфікуючим розчином перекису водню та водою питною із візуальним контролем якості обробки.

ДР 1.4.3. Стерилізація обладнання.

Посуд стерилізують в автоклаві при температурі 121°C протягом 1 години. Для контролю автоклавування використовують хімічні і біологічні термоіндикатори.

Процес стерилізації обладнання та вузлів обладнання проводиться гострою парою за тиску 0,2 МПа при температурі 140°C протягом 1 години, якщо не зазначено інших умов для певного апарату. Після цього апарати перевіряють на герметичність, створюючи надлишковий тиск 0,25 МПа і протягом 30 хв спостерігаючи за показами манометра. Вони повинні бути сталими.

ДР 2. Підготовка повітря.

ДР 2.1. Підготовка вентиляційного повітря.

Повітря виробничих приміщень є потенційним джерелом забруднення, тому його очищення є одним із ключових питань технологічної гігієни. Це досягається використанням фільтрів відповідної ефективності. Згідно з GMP, визнаним підходом, що застосовується на виробництві лікарських препаратів, є багатостадійна фільтрація повітря.

При подачі повітря в приміщення необхідно забезпечити виконання чотирьох основних операцій:

- стиснення повітря для подолання опору повітроводів та арматури;
- видалення пилу та інших частинок;
- видалення та знищення залишкових мікроорганізмів;
- регулювання температури та вологості.

ДР 2.1.1. Забір повітря

Підготовка вентиляційного повітря включає в себе операції з забору повітря з атмосфери за допомогою повітрязабірника через забірну шахту висотою 20–30 м, де концентрація мікроорганізмів стабілізована.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

Температура та вологість зовнішнього повітря, кількість пилу та мікроорганізмів в ньому непостійна та залежить від пори року, погодних умов, географічного розташування підприємства та висоти забору повітря.

ДР 2.1.2. Очистка повітря від механічних домішок

Для попереднього очищення повітря фільтри грубої очистки, в яких з повітря вилучають механічні частки розміром більше 5 мкм. Ці фільтри запобігають забрудненню вентилятора та знижують кількість контамінантів. Для очищення повітря від грубого пилу використовують коміркові фільтри, заповнені фільтруючими матеріалами, у даному випадку - вінілопластиковою сіткою. Фільтри ФЯВ (коміркові з вінілопластиковою сіткою) надійні та зручні в експлуатації, тому для виробництва Біоспорину доцільно використовувати саме цей тип фільтрів попередньої очистки повітря.

Видалення механічних домішок відбувається при проходженні повітря крізь фільтр попередньої очистки повітря із діаметром пор фільтрувального матеріалу 5-10 мкм.

ДР 2.1.3. Нагнітання повітря

При проходженні через вентилятор при тиску 0,2 МПа відбувається нагнітання повітря.

ДР 2.1.4. Кондиціонування та стабілізація параметрів повітря

Через вентилятор повітря надходить до нагрівальної колонки, де відбувається усереднення та стабілізація фізико-хімічних показників повітря до температури 20°C та вологості 40-60%. На вході гострої пари в нагрівальну колонку та у місці зливу з неї конденсату розташовані вентилі. Завершується цей процес у повітряному фільтрі із діаметром пор фільтруючого матеріалу 1,5 мкм, де відбувається очистка повітря від дрібних частинок пилу та мікроорганізмів, які потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки. На виході з фільтру отримано вентиляційне повітря, яке надходить до приміщень.

ДР 2.2. Підготовка стерильного повітря.

ДР 2.2.1. Забір повітря

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Підготовка вентиляційного повітря включає в себе операції з забору повітря з атмосфери за допомогою повітрозабірника через забірну шахту висотою 20–30 м, де концентрація мікроорганізмів стабілізована. Температура та вологість зовнішнього повітря, кількість пилу та мікроорганізмів в ньому непостійна та залежить від пори року, погодних умов, географічного розташування підприємства та висоти забору повітря.

ДР 2.2.2. Очистка повітря від механічних домішок

Для попереднього очищення повітря фільтри грубої очистки, в яких з повітря вилучають механічні частки розміром більше 5 мкм. Ці фільтри запобігають забрудненню вентилятора та знижують кількість контамінантів. Для очищення повітря від грубого пилу використовують коміркові фільтри, заповнені фільтруючими матеріалами, у даному випадку - вінілопластиковою сіткою. Фільтри ФЯВ (коміркові з вінілопластиковою сіткою) надійні та зручні в експлуатації, тому для виробництва Біоспорину доцільно використовувати саме цей тип фільтрів попередньої очистки повітря.

Видалення механічних домішок відбувається при проходженні повітря крізь фільтр попередньої очистки повітря із діаметром пор фільтрувального матеріалу 5-10 мкм.

ДР 2.2.3. Нагнітання повітря

При проходженні через вентилятор при тиску 0,2 МПа відбувається нагнітання повітря.

ДР 2.2.4. Стабілізація термодинамічних показників повітря

Через вентилятор повітря надходить спочатку до теплообмінника, де охолоджується до температури 20°C, а потім до ресивера, де відбувається усереднення та стабілізація фізико-хімічних показників повітря до тиску 0,2 МПа, вологості 40-60%, зменшення пульсації тиску та видалення залишків масляного туману. На лінії підводу повітря до ресиверу встановлені запорний вентиль з електроуправлінням та зворотній клапан. На вході гострої пари в ресивер, в місці зливу з нього конденсату, а також на виході відпрацьованого пару розташовані вентилі. Завершується цей процес у повітряному фільтрі із

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		68

діаметром пор фільтруючого матеріалу 1,5 мкм, де відбувається очистка повітря від дрібних частинок пилу та мікроорганізмів, які потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки.

ДР 2.2.5. Підігрів повітря.

Підігрів повітря відбувається в теплообміннику до температури, вищої від температури культивування на 5-10°C, тобто до 40-45°C, його вологість становить $W = 40 \%$.

ДР 2.2.6. Очищення повітря на головному фільтрі

На фільтрах зі стерилізуючим ефектом відбувається очистка повітря від дрібних частинок пилу та мікроорганізмів, які потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки. Після стабілізації в ресивері повітря надходить до головного фільтру типу HEPA 11 зі ступенем очистки 95%, де затримуються часточки до 1,5 мкм.

ДР 2.2.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Після очищення на головному фільтрі повітря поступає на індивідуальні фільтри типу ULPA, де затримуються часточки до 0,5 мкм. Ці фільтри забезпечують ступінь очистки від мікроорганізмів та їх спор до 99,999%. В індивідуальних фільтрах використовують спеціальні фільтруючі матеріали. В якості фільтруючого матеріалу доцільно використовувати матеріали на основі базальтового супертонкого волокна, базальтового мікротонкого волокна, синтетичних волокон, які при використанні не потребують створення додаткового тиску. У процесі очистки повітря контролюється тиск у системі, перепади якого можуть свідчити про мікробну контамінацію або наявність механічних часток. Після очистки на індивідуальному фільтрі стерильне повітря надходить до барботерів ферментерів для аерації культури продуценту.

ДР 3. Підготовка робочих розчинів

ДР 3.1. Приготування 10% розчину гідроксиду натрію.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

Для приготування 30 л 10% розчину NaOH у збірник засипаємо 3000 г гідроксиду натрію, який зважують на електричних вагах, заливають 30 л води питної, перемішують 5 – 10 хв.

ДР 3.2. Стерилізація розчину гідроксиду натрію.

Стерилізацію здійснюють при температурі 131°C протягом 40 хв. Не допускається контамінація розчину.

ДР 4. Підготовка пластикових флаконів та пластикових кришечок.

Напівпродукт Біоспорину (культуральна рідина з захисним середовищем сушіння) розливається у пластикові флакони, об'ємом 5 мл, по 4 мл на стадії ТП 10.1. Далі у флаконах напівпродукт висушується, утворюється ліофільно висушений порошок або пориста маса - готовий продукт. Після висушування флакони герметично закривають за допомогою пластикових кришечок через гігроскопічність продукту. Пластикові флакони та пластикові кришки проходять наступні стадії підготовки.

ДР 4.1. Мийка та ополіскування тари.

Флакони та пластикові кришки миються в миючих апаратах розчином миючого засобу та ополіскуються питною водою. Мийку тари проводять при температурі від 35 до 60°C протягом 20 хвилин.

ДР 4.2. Сушка тари.

Сушка тари після мийки та ополіскування відбувається в сушильній шафі при температурі 105°C протягом 1 години. Після цього пластикові флакони, пластикові кришки подаються в шафу для зберігання і подальшого фасування готового препарату. На цьому етапі відбувається відбракування некондиційної тари, яка йде на знешкодження відходів.

ДР 5. Підготовка поживного середовища.

ДР 5.1. Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу.

На вагах зважують 2 наважки гідролізату казеїну по 2 г, засипають у колби, місткістю 200 мл, та додають по 150 мл питної води. Колби з розчинами, що піддаються стерилізації, закривають ватно-марлевими

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

пробками, накривають обгортувальним папером, обв'язують шпагатом, потім стерилізують в автоклаві в режимі $t = 121^{\circ}\text{C}$, $p = 0,3$ МПа протягом 15 хвилин.

ДР 5.2. Приготування та стерилізація термостабільних компонентів поживного середовища.

У збірник з перемішуючим пристроєм завантажують питну воду у визначеному об'ємі. При перемішуванні додають усі термостабільні компоненти середовища (гідролізат казеїну, кукурудзяний екстракт та солі: MgSO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 , NaCl , CaCl_2) у відповідній кількості (попередньо зважені наважки) за допомогою дозатора. Перемішування проводять протягом 30 хв при 30-40 об/хв після внесення всіх компонентів середовища. Стерилізацію проводять «гострою» парою 0,3 МПа при температурі 125°C протягом 15 хв.

ДР 5.3. Приготування та стерилізація термолабільних компонентів поживного середовища.

На вагах зважують наважку глюкози та засипають у колбу та додають необхідну кількість питної води. Глюкозу розчиняють в гарячій питній воді (температура приблизно 60°C). Колби з розчинами, що піддаються стерилізації закривають ватно-марлевими пробками, накривають обгортувальним папером, обв'язують шпагатом, потім стерилізують в автоклаві в режимі $t = 121^{\circ}\text{C}$, $p = 0,2$ МПа протягом 30 хвилин.

ДР 5.4. Змішування компонентів поживного середовища.

До збірника із стерильним середовищем (без глюкози) додають через дозатор стерильну глюкозу, після чого проводять перемішування протягом 15 хв при 30-40 об/хв., а потім охолоджують до температури 37°C , подачею холодної водопровідної води в сорочку збірника. Надлишковий тиск не менше 0,05 МПа. Середовище придатне до застосування 1 добу.

На цьому етапі проводиться контроль мікробіологічної чистоти середовища шляхом висіву проб на чашки Петрі із подальшим інкубуванням у термостаті.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

ДР 6. Підготовка захисного середовища.

ДР 6.1. Приготування та стерилізація розчину желатини.

13,5 кг желатини зважують на вагах і переносять у реактор змішувач, куди заливають 150 л води питної. Залишають набрякати при кімнатній температурі на 3 години.

Потім нагрівають до температури 50-60°C для повного розчинення желатини. Отриманий розчин желатини фільтрують через фільтр.

Стерилізація відбувається при температурі 121°C протягом 15 хвилин.

Отриманий 9% розчин передають на операцію ДР 6.3. Приготування сахарозо-желатинового середовища.

ДР 6.2. Приготування розчину сахарози.

135 кг сахарози зважують на вагах і переносять у реактор-змішувач, куди наливають 450 л води питної, що має температуру 60-80°C. Вміст реактора ретельно перемішують до повного розчинення сахарози. Отриманий 30% розчин передають на операцію ДР 6.3. Приготування сахарозо-желатинового середовища.

ДР 6.3. Приготування та стерилізація сахарозо-желатинового середовища

Розчин желатини від ДР 6.1 і розчин сахарози від ДР 6.2 змішують в збірнику стерилізують при температурі 110°C, тиску 0,05 МПа протягом 30 хвилин.

По закінченню стерилізації проводять контроль сахарозо-желатинового середовища на стерильність. Посіви інкубують у термостаті при (38±1)°C протягом 24 годин. У контрольних посівах повинен бути відсутній ріст мікроорганізмів.

ТП 7. Підготовка посівного матеріалу.

При виробництві Біоспорину використовуються два штами *Bacillus subtilis* 3/Re і *Bacillus licheniformis* 31/Re. Всі операції здійснюються окремо з кожним штамом. Еталонні штами надходять в ліофілізованому стані у флаконах (ампулах).

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						72
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

В процесі культивування на кожній стадії контролюють мікробіологічну чистоту культури, температуру та рН.

*ТП 7.1. Підготовка посівного матеріалу *B.subtilis**

ТП 7.1.1. Відновлення музейної культури

Перед відновленням музейної культури попередньо готують МПА в колбі за інструкцією на упаковці та стерилізують в автоклаві при температурі 121 °С 15 хв. Вміст флакона із кріоконсервованою культурою продуценту висівають у стерильних умовах у пробірки із затверднувшем МПА та інкубують в термостаті при температурі 30°C протягом 48 годин. Після інкубації візуально оцінюють культуральні властивості (розмір, форму, краї, поверхню, колір, прозорість колоній), мікроскопічні та морфологічні ознаки продуценту, перевіряючи мікробіологічну чистоту.

ТП 7.1.2 Вирощування культури в колбах.

Для висіву мікроорганізмів у флакон додають 1 мл фізіологічного розчину NaCl. Флакони струшують і за допомогою мікробіологічної петлі пересівають у колбу, місткістю 200 мл, із 150 мл стерильного середовища на основі гідролізату казеїну (з ДР 5.1). Після цього колби закривають ватно-марлевими пробками. Колбу поміщають у термостат, підтримують температуру $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Посів витримують при зазначеній температурі протягом 48 годин.

ТП 7.1.3. Вирощування посівного матеріалу в посівному ферментері.

У посівний ферментер, об'ємом 30 л, в якому знаходиться 15 дм³ поживного середовища на основі гідролізату казеїну, глюкози та кукурудзяного екстракту, асептично вносять посівний матеріал І генерації з колби. Культивування проходить за температури $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$, при достатній аерації 0,7 дм³ O₂ / дм³ поживного середовища та протягом 24 год.

ТП 7.1.4. Термоактивація інокуляту

Перед передачею інокуляту на виробниче культивування, його термоактивують для покращення засвоєння поживного середовища та прискорення технологічного процесу. Термоактивація здійснюється при

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						73
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

(70±1)°C не більше 30 хв. Після чого посівний матеріал перекачують до виробничого ферментеру для культивування *B.subtilis*. Інокулят має містити не менше 10⁴ живих бактерій на 1 дм³ поживного середовища.

ТП 7.2. Підготовка посівного матеріалу B.licheniformis

ТП 7.2.1. Відновлення музейної культури

Перед відновленням музейної культури попередньо готують МПА в колбі за інструкцією на упаковці та стерилізують в автоклаві при температурі 121 °C 15 хв. Вміст флакона із кріоконсервованою культурою продуценту висівають у стерильних умовах у пробірки із затверднувшем МПА та інкубують в термостаті при температурі 30°C протягом 48 годин. Після інкубації візуально оцінюють культуральні властивості (розмір, форму, краї, поверхню, колір, прозорість колоній), мікроскопічні та морфологічні ознаки продуценту, перевіряючи мікробіологічну чистоту.

ТП 7.2.2 Вирощування культури в колбах.

Для висіву мікроорганізмів вміст флакону розводять в 1 мл фізіологічного розчину NaCl. Вміст флаконів струшують і за допомогою петлі пересівають у колбу, місткістю 200 мл, з 150 мл стерильного казеїнового бульйону (з ДР 5.1), закривають ватно-марлевими пробками. Колбу поміщають на качалку, підтримують температуру (37±1)°C. Посів витримують при зазначеній температурі протягом 48 годин.

ТП 7.2.3. Вирощування посівного матеріалу в посівному ферментері.

У посівний ферментер, об'ємом 10 л, в якому знаходиться 5 дм³ поживного середовища на основі гідролізату казеїну, глюкози та кукурудзяного екстракту, вносять посівний матеріал I генерації з колби, дотримуючись правил асептики. Культивування проходить за температури (37±1)°C, при достатній аерації 0,4 дм³ O₂ / дм³ поживного середовища та протягом 24 год.

ТП 7.2.4. Термоактивація інокуляту

Перед передачею інокуляту на виробниче культивування, його термоактивують для покращення засвоєння поживного середовища та

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

прискорення технологічного процесу. Термоактивація здійснюється при $(70\pm 1)^{\circ}\text{C}$ не більше 30 хв. Після чого посівний матеріал перекачують до виробничого ферментеру для культивування *B.licheniformis*. Інокулянт має містити не менше 10^4 КУО на 1 дм^3 поживного середовища.

ТП 8. Виробниче культивування.

Глибинне культивування *B.subtilis* і *B.licheniformis* здійснюють окремо у ферментерах різного об'єму (0,25 та $0,1\text{ м}^3$ відповідно), обладнаних сорочкою для теплообмінної рідини, перемішувальним пристроєм і барботером для подачі стерильного аеруючого повітря.

ТП 8.1. Виробниче культивування культури *B.subtilis*.

Зі збірника із поживним середовищем перекачують поживне середовище об'ємом 135 дм^3 (коефіцієнт заповнення – 0,6). Після цього перекачуванням вносять посівний матеріал. Після внесення посівного матеріалу культивування проходить за таких умов: температура $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$, постійне перемішування 325 об/хв, аерація (не менш як $0,7\text{ м}^3\text{ O}_2 / \text{м}^3$ середовища за 1 хв). Біомасу контролюють за показником оптичної густини за довжини хвилі 540 нм, концентрацію живих клітин - за методом Коха, рівень спороутворення - мікроскопіюванням (фарбування за Цілем-Нільсеном). У разі досягнення не менш як 50 % спор процес зупиняють. Оптимальний час вирощування для кожної серії глибинних бактеріальних культур визначається індивідуально і становить від 24-26 до 33-36 год. Упродовж виробничого культивування періодично відбирають проби культуральної рідини для визначення кількості живих клітин (КУО/ см^3). Під кінець культивування кількість КУО повинна становити не менше $10\cdot 10^9$ КУО/ см^3 . Культуральну рідину охолоджують до температури не вище ніж 8°C . Якщо впродовж 2 год культуральну рідину не буде використано для одержання препарату Біоспорин, її сепарують в асептичних умовах (сепаратори типу АСГ-ЗМБ або УКВ-202Н-0Д) з наступним ресуспендуванням біомаси (у вигляді пастоподібної маси) в ізотонічному розчині хлориду натрію концентрацією 0,85%.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						75
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

*ТП 8.2. Виробниче культивування культури *B.licheniformis*.*

Зі збірника із поживним середовищем перекачують поживне середовище об'ємом 45 дм³ (коефіцієнт заповнення – 0,5). Після цього перекачуванням вносять посівний матеріал. Після внесення посівного матеріалу культивування проходить за таких умов: температура (37±1)°С, постійне перемішування 500 об/хв, аерація (не менш як 0,4 м³ О₂ / м³ середовища за 1 хв). Біомасу контролюють за показником оптичної густини за довжини хвилі 540 нм, концентрацію живих клітин - за методом Коха, рівень спороутворення - мікроскопіюванням (фарбування за Цілем-Нільсеном). У разі досягнення не менш як 50 % спор процес зупиняють. Оптимальний час вирощування для кожної серії глибинних бактеріальних культур визначається індивідуально і становить від 24-26 до 33-36 год. Упродовж виробничого культивування періодично відбирають проби культуральної рідини для визначення кількості живих клітин (КУО/см³). Під кінець культивування кількість КУО повинна становити не менше 1,6*10⁹ КУО/см³. Культуральну рідину охолоджують до температури не вище ніж 8 °С. Якщо впродовж 2 год культуральну рідину не буде використано для одержання препарату Біоспорин, її сепарують в асептичних умовах (сепаратори типу АСГ-ЗМБ або УКВ-202Н-0Д) з наступним ресуспендуванням біомаси (у вигляді пастоподібної маси) в ізотонічному розчині хлориду натрію концентрацією 0,85%.

ТП 9. Отримання напівпродукту Біоспорину.

ТП 9.1. Змішування культуральних рідин із захисним середовищем сушіння.

У збірник, загальним об'ємом 1,5 м³, де знаходиться попередньо простерилізоване і охолоджене захисне сахарозо-желатинове середовище від ДР 6.3, завантажують культуральні рідини від ТП 8.1 та ТП 8.2. Перемішують до настання гомогенізації (протягом 10-15 хв).

ТП 9.2. Стабілізація культуральної рідини.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

10%-им розчином NaOH регулюється рН 7,0-7,4, одержуючи напівпродукт Біоспорину. На цій стадії обов'язково здійснюють мікробіологічний контроль напівпродукту на відсутність сторонньої мікрофлори.

ТП 10. Ліофільне сушіння напівпродукту.

ТП 10.1. Розлив та заморожування напівпродукту.

Стабілізовану захисним середовищем та робочим розчином гідроксиду натрію культуральну рідину (мікробну суспензію) розливають на апаратах розливу у флакони по 4,0 см³ і заморожують за температури (-40)°С упродовж 18-24 год в установках глибокого заморожування. Причому флакони повинні бути розміщені вертикально. Після розливу та після заморожування, для уникнення контамінації при транспортуванні, флакони накривають стерильним марлевым простирадлом і медичною клейонкою, з подальшою передачею до сушарки.

ТП 10.2. Ліофільне сушіння.

Після заморожування препарат ліофільно сушать у сублімаційних сушильних установках ТГ-50. Рідина під дією заморожування і глибокого вакууму, а згодом і температури сублімується у вигляді водяної пари вивітрюється з флаконів. Водяна пара потрапляє в льодоконденсатор, на пластині якого при температурі (-60)°С йде десублімація і випадає осад у вигляді інею. Температуру підвищують по 3°С на годину і до 30 годин сушіння вона досягає +40°С. При +18°С препарат витримують 18 годин. Весь процес триває протягом 48 годин при р=10 Па до кінцевої вологості 3-4 %. Після закінчення процесу сушіння відкривають камеру та вивантажують продукцію.

ТП 11. Закупорювання флаконів.

Флакони із сухою мікробною масою закупорюють під вакуумом або в потоці інертного газу. З дотриманням правил асептики флакони закупорюють підготованими пластиковими кришками. Допустима похибка при фасуванні не повинна перевищувати ± 3%.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

ПМВ 12. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту.

На флакони на автоматичній лінії наноситься етикетка з паперу етикетного або паперу письмового, виготовлена поліграфічним способом друку або тисненням із зазначенням необхідної для зберігання, подальшої реалізації та транспортування інформації. Флакони з препаратом пакують у вторинну тару - картонні коробки з перетинками згідно ГОСТ 12301-2006, по 10 флаконів у партії. На коробку наносять або вкладають всередину друковану етикетку з інформацією щодо продукту. Коробки закривають та відправляють на склад для подальшого зберігання або реалізації.

ЗВ 13. Знешкодження відходів та промислових викидів

В процесі виробництва утворюється ряд відходів, які проходять стадії знезараження. Проводять знезараження вентиляційного та стерильного повітря, конденсату, некондиційного посівного матеріалу та культуральної рідини, промислових стоків, партій бракованого препарату тощо.

Очищення повітря, яке містить живі клітини мікроорганізмів, краплі культуральної рідини з продуктами метаболізму передбачає наявність спеціального сепаратора для відділення крапель і піни з подальшою очисткою від клітин мікроорганізмів в скрубєрі та повторного використання у якості вентиляційного чи технологічного повітря.

Некондиційний посівний матеріал, отриманий в посівному апараті та некондиційну культуральну рідину, отриману в ферментері, піддають термічній обробці у вказаних апаратах гострою парою тиском $P = 0,3$ МПа при температурі 130-132°C протягом (40 ± 5) хвилин, охолоджують подачею холодної технічної води в сорочку до 25-30°C, розбавляють водою до окислення 450-700 мг/л, доводять рН середовища до 7,0 соляною кислотою або розчином натра їдкого та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему.

Промивні дезінфікуючі розчини, залишки розчинів синтетичного миючого засобу після санітарної обробки виробництва та відпрацьовану воду

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78

направляють до збірника нейтралізації стічних вод, де розводять водою в 3-4 рази, встановлюють рН на рівні 7,0 за допомогою розчинів соляної кислоти чи їдкого натру, та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему. В цей же збірник зливають промивні води після мийки посівних та виробничих ферментерів.

Тверді відходи виробництва у вигляді склобою, рукавичок, упаковочних матеріалів, бракованих флаконів, кришечок утилізуються на міському сміттєзвалищі.

ПВ 14. Переробка відходів

У даному виробництві використовуються матеріали та речовини, що можуть повторно використовуватися при належній їх обробці. В основному це фільтрувальні матеріали.

Відновлення тканинних фільтрів, що використовуються при підготовці повітря, відбувається за рахунок вимочування їх в гарячій воді з подальшим чищенням та обробкою дезінфікуючими розчинами.

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва пробіотику Біоспорину розрахований на 20000 упаковок по 10 флаконів наведено у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс виробництва

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та витрат	Кількість		
	кг	шт	л		кг	шт	л
1	2	3	4	5	6	7	8
ТП 8. Виробниче культивування ТП 8.1 Виробниче культивування <i>B.subtilis</i>							

Поживне середовище: Вода питна Гідролізат казеїну Кукурудзяний екстракт Глюкоза Магній сірчаноокислий 7-водний Натрій хлористий Кальцій хлористий Залізо (II) сірчаноокисле 7-водне Марганець (II) сірчаноокислий 5-водний	1,2 9 1,65 0,05 625 0,15 0,02 25 0,00 015 0,00 45		138	Культуральна рідина з <i>B.subtilis</i>			150
Посівний матеріал <i>B.subtilis</i>			15	Втрати	12,0 834		3
Всього	165,0834			Всього	16,0834		

ТП 8.2 Виробниче культивування *B.licheniformis*

Поживне середовище: вода питна гідролізат казеїну кукурудзяний екстракт глюкоза магній сірчаноокислий 7-водний Натрій хлористий Кальцій хлористий Залізо (II) сірчаноокисле 7-водне Марганець (II) сірчаноокислий 5-водний	0,6 4,75 1,05 0,04 0 0,05 0,00 75 0,00 005 0,00 08		51	Культуральна рідина з <i>B.licheniformis</i>			50
Посівний матеріал <i>B.licheniformis</i>			5	Втрати	6,49 835		1

Всього:	57,49835			Всього:	57,49835		
ТП 9. Отримання напівпродукту Біоспорину							
Сахарозно-желатинове захисне середовище			600	Напівпродукт Біоспорину			800
Культуральна рідина <i>B.subtilis</i>			150	Втрати			16
Культуральна рідина <i>B.licheniformis</i>			50				
10% розчин натрію гідроксиду			16				
Всього:	816			Всього:	816		
ТП 10. Ліофільне сушіння напівпродукту							
Флакони		200 000		Наповнені Біоспорином флакони		200 000	
Напівпродукт Біоспорину			800	Вода			770
				Втрати			30
Всього:	200800			Всього:	200800		
ТП 11. Закупорювання флаконів							
Флакони з Біоспорином		200 000		Закупорені флакони з препаратом		200 000	
Кришки пластикові		200 050		Кришки на флаконах		200 000	
				Втрати		50	
Всього:	400050			Всього:	400050		
ПМВ 12. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту							
Укупорений сухий препарат Біоспорин у флаконах		200 000		Упаковані флакони з готовим препаратом Біоспорин		200 000	
Етикетки		200 000		Етикетки на флаконах		200 000	
Інструкція		201 00		Інструкції в коробках		200 00	
Коробка пакувальна		201 00		Запаковані коробки з флаконами		200 00	
				Втрати		200	
Всього:	440200			Всього:	440200		

4.5. Контроль виробництва

Контроль виробництва здійснюється з метою отримання якісного продукту, що відповідає наведеним вище вимогам. Основні точки, параметри контролю та межі їх змін подані в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3. Контроль виробництва.

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що контролюється	Метод контролю	Періодичність перевірок	Нормативна харак-теристика показника
ДР 1.1. Підготовка персоналу Кмб 1.1.1	Руки персоналу, мікробна контамінація	Мікробіологічний	Змиви тампонами 2 рази в тиждень під час роботи і 1 раз у 2 тижні після обробки дез. засобами	Після дез. Обробки – не повинні містити м-о. У процесі роботи – не більше 5 КУО у змивах з рук одного працюючого
ДР 1.2.1. Приготування розчину перекису водню 6% Кт 1.2.1.1	Перекис водню, кількість перекису водню	Ваги, мірний посуд, кількісні методи визначення концентрації	Кожну операцію	6%
ДР 1.2.2. Приготування розчину миючого засобу Кт 1.2.2.1	Порошок СМЗ, кількість СМЗ	Мірний посуд, ваги, візуально	Кожну операцію	10%

ДР 1.2.3. Приготування розчину етилового спирту 70% Кт 1.2.3.1	Етиловий спирт, кількість, етилового спирту	Ваги, мірний посуд, фізичні методи визначення концентрації	Кожну операцію	70 %
ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень Кмб 1.3.1	Кількість мікроорганізм ів	Змиви з поверхонь	Після підготов ки приміще нь	Клас В: КУО<10; Клас С: КУО<100; Клас Д: КУО<200
ДР 1.4.1 Мийка вузлів обладнання Кт 1.4.1.1	Температура	Регулятор температур	Кожну операцію	40°C
ДР 1.4.2. Дезінфекція обладнання Кт 1.4.2.1 Кмб 1.4.2.2	Температура, тривалість, мікробна контамінація	Регулятор температур, годинник, висіви на чашки Петрі	Під час виробни чого процесу	55-65°C, 1,5-3 год, КУО < 2
ДР 1.4.3. Стерилізація обладнання Кмб 1.4.3.1 Кт 1.4.3.2	Режим стерилізації, температура, тривалість, мікробна контамінація, герметичність	Регулятор температур, манометр, годинник, змиви з поверхонь, нагнітання надлишковим тиском	Кожну операцію	121°C, 1 год – для посуду, 140°C, 1 год, 0,2 МПа, КУО відсутні, сталі покази манометра протягом 30 хв нагнітання 0,25 МПа надлишкового тиску
ДР 2.1.1 Забір повітря Кт.2.1.1.1	Повітря з атмосфери, кількість частинок	Пропускна здатність повітрязабірник а	Кожну операцію	2000 частинок /м ³
ДР 2.1.2. Очистка повітря від механічних домішок Кт 2.1.2.1	Повітря, ступінь чистоти повітря	Ефективність очистки повітря	Кожну операцію	E=80%

ДР 2.1.3. Нагнітання повітря Кт 2.1.3.1	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 2.1.4. Кондиціонування та стабілізація параметрів повітря Кт 2.1.4.1	Температура та вологість повітря	Термометр, вологомір	Під час нагрівання	20 °С, 40-60%
ДР 2.2.1. Забір повітря Кт 2.2.1.1	Повітря з атмосфери, кількість частинок	Пропускна здатність повітрязабірника	Кожну операцію	2000 частинок /м ³
ДР 2.2.2. Очистка повітря від механічних домішок Кт 2.2.2.1	Ступінь чистоти повітря	Ефективність очистки повітря	Кожну операцію	E=80%
ДР 2.2.3. Нагнітання повітря Кт 2.2.3.1	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
ДР 2.2.4. Стабілізація термодинамічних показників повітря Кт 2.2.4.1	Температура, тиск повітря	Термометр, манометр	Кожну операцію	20 °С, 0,2 МПа
ДР 2.2.5. Підігрів повітря Кт 2.2.5.1	Температура та вологість повітря	Термометр, вологомір	Кожну операцію	40-45 °С, 40%
ДР 2.2.6. Очищення повітря на головному фільтрі Кт 2.2.6.1 Кмб 2.2.6.2	Повітря, вміст мікроорганізмів та часток	Метод визначення мікробної контамінації (проба повітря КУО/м ³), седиментація	Кожної зміни, під час культивування	< 2 КУО/м ³ , max = 200 часток/м ³ , E=95%

ДР 2.2.7. Очищення повітря на індивідуально му фільтрі Кт 2.2.7.1 Кмб 2.2.7.2	Повітря, ефективність очистки, вміст мікроорганізм ів та часток	Проба повітря, часточки бруду	Безперер вно при подачі повітря	E=99,999%, max = 10 часток/м ³ , не має життєздатних мікроорганізмів
ДР 3.1. Приготування 10% розчину гідроксиду натрію Кт 3.1.1	Розчин гідроксиду натрію, кількість гідроксиду натрію	Мірний посуд, ваги, ваговий метод	Кожну операцію	10%
ДР 3.2. Стерилізація розчину гідроксиду натрію Кт 3.2.1 Кмб 3.2.2	Режим стерилізації, температура та час, мікробна контамінація	Регулятор температур, годинник, посіви на чашки Петрі	Кожну операцію	131°C, 40 хв, відсутність контамінації
ДР 4.1. Мийка та ополіскування тари Кт 4.1.1	Температура, час	Регулятор температур, годинник	Кожен цикл	35-60 °C, 20 хв
ДР 4.2. Сушка тари Кт 4.2.1	Температура, час, цілісність тари	Регулятор температур, годинник, візуально	Кожен цикл	105°C, 1 год, відповідність кондиційному стану
ДР 5.1. Приготування поживного середовища для отримання посівного матеріалу Кт 5.1.1 Кмб 5.1.2	Вміст гідролізату казеїну, режим стерилізації, мікробна контамінація	Мірний посуд, ваги, регулятор температур, манометр, годинник, мікроскопіюван ня	Кожен цикл	2 г гідролізату казеїну на 150 мл води, 121°C, 0,3 МПа, 15 хв, відсутність контамінації

ДР 5.2. Приготування та стерилізація термостабільних компонентів поживного середовища Кт 5.2.1 Кмб 5.2.2	Режим стерилізації, мікробна контамінація	Термометр, манометр, годинник, відбір проби середовища	Кожен цикл	125 °С, 15 хв, 0,3 МПа, відсутність контамінації
ДР 5.3. Приготування та стерилізація термолабільних компонентів поживного середовища Кт 5.3.1	Режим стерилізації	Термометр, манометр, годинник	Кожен цикл	121°С, 30 хв, 0,2 МПа
ДР 5.4. Змішування компонентів поживного середовища Кт 5.4.1 Кмб 5.4.2	Температура, рН, мікробна контамінація поживного середовища	Холодоагент в сорочці, термометр, рН, висів проб на чашки Петрі	Кожен цикл	37 °С, рН = 7,0±0,5, відсутність контамінації
ДР 6.1. Приготування та стерилізація розчину желатини Кт 6.1.1	Розчин желатин, кількість желатини, режим стерилізації	Мірний посуд, ваги, ваговий метод	Кожний цикл	9%, 121 °С, 15 хв
ДР 6.2. Приготування розчину сахарози Кт 6.2.1	Розчин сахарози, кількість сахарози	Мірний посуд, ваги, ваговий метод	Кожний цикл	30%
ДР 6.3. Приготування та стерилізація сахарозо- желатинового середовища Кт 6.3.1 Кмб 6.3.2	Режим стерилізації, мікробна контамінація	Регулятор температур, манометр, годинник, відбір проби та висів на чашки Петрі	Кожний цикл	110°С, 30 хв, 0,05 МПа, відсутність контамінації

ТП 7.1.1. Відновлення музейної культури Кт 7.1.1.1 Кмб 7.1.1.2	Бактеріальний штам <i>B.subtilis</i> , морфологія, культуральні ознаки, мікробіологіч на чистота культури	Мікроскопіюван ня	Кожний цикл	Відповідність розміру, форми клітин; країв, колір та прозорість колонії, відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 7.1.2 Вирощування культури в колбах Кт 7.1.2.1 Кмб 7.1.2.2	Температура, час, мікробіологіч на чистота культури, морфологія	Термометр, годинник, забір проби, мікробіологічни й метод, мікроскоп	Протяго м процесу	37±1°C, 48 год, відсутність сторонньої мікрофлори, відповідна морфологія
ТП 7.1.3. Вирощування посівного матеріалу в посівному ферментері Кт 7.1.3.1 Кмб 7.1.3.2	Температура, час, аерація, перемішуванн я, мікробіологі чна чистота культури, витрати повітря та води, рН	Термометр, годинник, мікрокалоримет р, забір проби, мікробіологічни й метод, витратомір, рН- метр	Протяго м процесу	37±1°C, 24 год, 0,7 м³/м³ відсутність сторонньої мікрофлори, рН=7,0±0,5
ТП 7.1.4. Термоактиваці я інокуляту Кт 7.1.4.1	Температура, час	Регулятор температур, годинник	Кожен цикл	70°C, 30 хв
ТП 7.2.1. Відновлення музейної культури Кт 7.2.1.1 Кмб 7.2.1.2	Бактеріальний штам <i>B.licheniformis</i> , морфологія, культуральні ознаки, мікробіологіч на чистота	Мікроскопіюван ня	Кожний цикл	Відповідність розміру, форми клітин; країв, колір та прозорість колонії, відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 7.2.2 Вирощування культури в колбах Кт 7.2.2.1 Кмб 7.2.2.2	Температура, час, мікробіологіч на чистота культури, морфологія	Термометр, годинник, забір проби, мікробіологічни й метод, мікроскоп	Протяго м процесу	37±1°C, 48 год, відсутність сторонньої мікрофлори, відповідна морфологія

ТП 7.2.3. Вирощування посівного матеріалу в посівному ферментері Кт 7.2.3.1 Кмб 7.2.3.2	Температура, час, аерація, перемішуванн я, мікробіологі чна чистота культури, витрати повітря та води, рН	Термометр, годинник, мікрокалоримет р, забір проби, мікробіологічни й метод, витратомір, рН- метр	Протяго м процесу	37±1°C, 24 год, 0,4 м ³ /м ³ відсутність сторонньої мікрофлори, рН=7,0±0,5
ТП 7.2.4. Термоактиваці я інокуляту Кт 7.2.4.1	Температура, час	Регулятор температур, годинник	Кожен цикл	70°C, 30 хв
ТП 8.1. Виробниче культивування культури <i>B.subtilis</i> Кт 8.1.1 Кмб 8.1.2	Температура, час, аерація, перемішуванн я, витрати повітря та води, рівень рН, фаза росту, мікробіологіч на чистота, герметичність, концентрація КУО в кінці культивуванн я	Регулятор температур, годинник, мікрокалоримет р, витратомір, рН-метр, мікроскоп, забір проби, манометр, фотокалориметр	Протяго м процесу	37±1°C (8°C – у кінці культивування), 26-36 год, 0,7 м ³ /м ³ рН=7±0,5, 325 об/хв, експоненціальн а фаза росту, 50% спор у кінці культивування, відсутність сторонньої мікрофлори, надлишковий тиск 0,03-0,04 МПа, ≥10·10 ⁹ КУО/мл

ТП 8.2. Виробниче культивування культури <i>B.licheniformis</i> Кт 8.2.1 Кмб 8.2.2	Температура, час, аерація, перемішуванн я, витрати аераційного повітря та води, рівень рН, фаза росту, мікробіологіч на чистота, герметичність, концентрація КУО у кінці культивуванн я	Регулятор температур, годинник, мікрокалоримет р, витратомір, рН-метр, тахометр, мікроскоп, забір проби, манометр, фотокалориметр	Протяго м процесу	37±1 °С (8 °С – у кінці культивування), 26-36 год, 0,4 м ³ /м ³ рН=7±0,5, 500 об/хв, експоненціальн а фаза росту, 50% спор у кінці культивування, відсутність сторонньої мікрофлори, надлишковий тиск 0,03-0,04 МПа, $\geq 1,6 \cdot 10^9$ КУО/мл
ТП 9.1. Змішування культуральних рідин із захисним середовищем сушіння Кт 9.1.1	Витрати захисного середовища, перемішуванн я	Витратомір, тахометр	Кожного циклу	3,33 с ⁻¹
ТП 9.2. Стабілізація культуральної рідини Кт 9.2.1 Кмб 9.2.2	рН, відсутність контамінації	рН-метр, відбір проб, мікробіологічни й метод	Кожного циклу	рН=7,0-7,4, відсутність сторонньої мікрофлори
ТП 10.1. Розлив та заморожуванн я напівпродукту Кт 10.1.1	Температура, час, розміщення флаконів, заповнення флаконів	Регулятор температур, годинник, візуально, апарат розливу	Під час процесу	-40 °С, 18-24 год, вертикально, по 4 мл у флакон
ТП 10.2. Ліофільне сушіння Кт 10.2.1	Вологість, вакуум, час, температура сушіння	Вологомір, манометр, годинник, регулятор температур	Під час процесу	3-4%, 10 Па, 48 год, температуру підвищують по 3°С/год, на 30-у годину сушіння

				- +40°C, при +18°C препарат витримують 18 годин
ТП 11. Закупорювання флаконів Кт 11.1	Контроль герметичності	Візуально, відбір флаконів по 1 на кожні 5000	Кожного циклу	Закритий флакон, без тріщин
ПМВ 12. Пакування, маркування, відвантаження готового продукту Кт 12.1	Маркування	Візуально, відбір флаконів по 1 на кожні 5000	Кожного циклу	Відповідне маркування флакону та картонної коробки, повна комплектація упаковки: інструкція та 10 флаконів
ЗВ 13. Знешкодження відходів та промислових викидів Кт 13.1 Кх 13.2 Кмб 13.3	Концентрація відходів	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних правил і норм
ПВ 14. Переробка відходів Кт 14.1 Кх 14.2 Кмб 14.3	Наявність хімічних, механічних, мікробіологічних забруднень	Кількісний хімічний та мікробіологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до НТД для даного матеріалу чи речовини

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва представлена на плакаті формату А1.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		90

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування обраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.

Виробниче культивування культур мікроорганізмів *B.subtilis* 3/Re та *B.licheniformis* 31/Re при виробництві пробіотичного препарату Біоспорин відбувається глибинним способом у ферментерах.

Глибинне культивування мікроорганізмів є доволі складним і тонким процесом при отриманні певного цільового продукту шляхом мікробного синтезу. Біосинтез цільового продукту залежить від таких факторів як температура, рН середовища, особливостей культури мікроорганізму, концентрації розчиненого кисню, тривалості культивування, конструкції та матеріалу обладнання, в якому відбувається процес культивування. Тому особливу увагу слід приділити апаратам, що використовуються для процесу глибинного культивування мікроорганізму [72].

Оптимальними умовами для вирощування штамів-продуцентів препарату Біоспорин є виконання наступних вимог (у дужках зазначено умови для вирощування *B.licheniformis* 31/Re:

- температура вирощування мікробної культури 37 ± 1 °C;
- інтенсивність аерації $0,7 \text{ м}^3/\text{м}^3$ ($0,4 \text{ м}^3/\text{м}^3$)
- постійне перемішування 325 об/хв. (500 об/хв).

В залежності від застосовуваних методів роботи ферментери для глибинного культивування мікроорганізмів поділяються на групи за наступними ознаками:

➤ за способом культивування - на апарати безперервної та періодичної дії;

					ДП 6221 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Щердина В.Ю.			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	Стадія	Аркуш
Консульт.		Фесенко С.В.				Д	91
						Аркушів	
						120	
Керівник		Яловенко О.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського	
Затвер.						ФБТ	

- за стерильністю - на герметичні та ті, що не потребують суворої стерильності
- за конструктивними ознаками - на ферментери з дифузором та турбіною, з рухомими аераторами, з механічними мішалками, з зовнішнім циркуляційним контуром, колоні ферментери з ежекційною системою аерації;
- за способом введення енергії і організації перемішування та аерації - на апарати з підведенням енергії до газової фази, до рідкої фази та комбіновані [71].

Культивування біологічних агентів, серед яких найбільш популярними продуцентами біологічно активних речовин, біомаси та іншого є мікроорганізми, орієнтоване на використання ферментерів різних конструкцій. Для проектування, експлуатації та розробки конструкцій ферментерів, що призначені для реалізації широкого кола варіантів культивування біологічних агентів потрібна адекватна класифікація відомих промислових ферментерів та аналіз специфічних особливостей процесів, що супроводжують біосинтез.

Ферментер повинен забезпечувати оптимальні умови для культивування специфічного продуценту. Найбільш важливими є гідродинамічні та масообмінні параметри культивування. Серед класифікацій типових конструкцій промислових ферментерів найбільш популярною і визнаною є класифікація за способом введення енергії в культуральну рідину з метою його гомогенізації та забезпечення теплових та масообмінних процесів.

Перемішування, як основний енерговитратний процес, що відбувається у ферментері реалізує процес перенесення компонентів багатофазної системи. Це досягається взаємодією двох або більше речовин в обмеженому об'ємі під дією імпульсу, що надходить від мішалки, за рахунок подачі рідини або газу. Перемішування в аеробних процесах реалізується одним з трьох способів введення енергії в культуральну рідину:

– стисненим газом (пневматичне перемішування);

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						92
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- при використанні механічних перемішуючих пристроїв обертового або іншого типу руху;
- за допомогою енергії рідинної фази [72].

Виходячи з вищезазначених вимог, що до культивування даного продуценту і аналізу літературних даних обираємо ферментер з механічним перемішуючим пристроєм. Дані ферментери широко використовуються у асептичних процесах вирощування мікроорганізмів-продуцентів.

Ферментери, в які введення енергії здійснюється механічними перемішуючими пристроями, можна класифікувати за особливостями конструкції як самого реактора, так і за особливостями мішалок. В цьому випадку мішалка є робочим елементом механічного перемішуючого пристрою. Перемішування в промислових ферментерах може здійснюватись всім спектром відомих мішалок, що використовуються в рідкофазних системах, але в біотехнології традиційно перевага надається лопатевим, гвинтовим та турбінним мішалкам, які працюють при в'язкості культуральної рідини не більше 50 Па·с [72].

Мішалки можуть бути розділені на такі основні групи:

- лопатеві;
- якірні;
- рамні;
- пропелерні;
- турбінні.

Щоб обрати найбільш оптимальну мішалку для процесу коротко розглянемо, у яких випадках використовуються вище перелічені:

1. Лопатеві. Перемішування взаєморозчинних рідин, змішування твердих і волокнистих часток у рідині, змішування легких осадів, повільне розчинення кристалічних і волокнистих речовин.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		93

2. Якірні і рамні. Перемішування в'язких і важких рідин, інтенсифікація теплообмінних процесів, попередження випадіння осаду на стінках і на днищі, суспендування у в'язких середовищах.

3. Турбінні. Зважування і розчинення твердих кристалічних часток (з масовим вмістом до 5%); емульгування рідин з великою різницею густин; перемішування ньютонівських рідин.

4. Пропеллерні. Змішування твердих (з масовим вмістом до 50%) і волокнистих часток, емульгування рідин, інтенсифікація теплообміну.

Виходячи з вищезазначених вимог і аналізу літературних даних, було вирішено обрати у якості ферментеру циліндричний апарат з еліптичними днищем і кришкою. У якості перемішуючого пристрою обрана турбінна мішалка, яка забезпечує необхідну інтенсивність перемішування без шкідливого впливу на культуру, що вирощується.

В процесі біосинтезу відбувається виділення тепла, тому для забезпечення ефективності процесу необхідна наявність сорочки. На кришці апарату передбачено кілька штуцерів, а саме для подання посівного матеріалу, поживного середовища, технічний люк. Передбачена наявність технологічного штуцера для введення миючих засобів. Зливний штуцер розташовано знизу. Також в корпусі апарату розміщено барботер.

На кришці апарату передбачено декілька штуцерів: для подачі очищеної води, повітря, пари для стерилізації, миючих засобів, завантаження посівного матеріалу та поживного середовища, а також технічний люк.

На днищі корпусу розташовано штуцер для зливу розчину по закінченню процесу. Ще три штуцери розміщені на сорочці: для входу і виходу теплоносія [71-73].

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		94

5.2. Технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки

1. Апарат призначений для культивування бактерій *B.subtilis* 3/Re.
2. Номінальний об'єм апарата, м³ 0,25;
3. Коефіцієнт заповнення 0,5;
4. Площа поверхні теплообміну рубашки, м² 0,052;
5. Робочий тиск, МПа:
 - в апараті 0,13;
 - в сорочці 0,3;
6. Температура середовища в апараті, °C 37;
7. Тип перемішуючого пристрою – мішалка турбінна відкрита
 - кількість мішалок 1;
 - частота обертання валу мішалки, с⁻¹ 5,2;
 - потужність приводу, кВт 1;
8. Габаритні розміри:
 - довжина 820 мм;
 - ширина 800 мм;
 - висота 767 мм;
9. Маса 440 кг

5.2.1 Технологічний розрахунок

Розраховуємо один з ферментерів для виробництва пробіотичного препарату Біоспорин, продуцент *Bacillus subtilis* 3/Re. Об'єм апарату – 0,25 м³, коефіцієнт заповнення – $K_z = 0,6$. Температура в апараті підтримується на рівні $t_k = 37$ °С. Температура охолоджуючого агента (води): на вході - $t_1 = 25$ °С, на виході – $t_2 = 32$ °С.

Розрахунок основних розмірів ферментеру.

Номінальний об'єм: $V_n = 0,25$ м³.

Коефіцієнт заповнення: $K_z = 0,6$.

Робочий об'єм: $V_p = V_n \cdot K_z = 0,25 \cdot 0,6 = 0,15$ м³.

За ГОСТ 20680-86 [74] серед вертикальних апаратів з механічним перемішуючим пристроєм і верхнім розташуванням приводів було обрано апарат з еліптичним днищем і еліптичною кришкою, що знімається (тип 0).

За ГОСТ 20680-86 задаємося наступними параметрами:

$D_{вн} = 700$ мм = 0,7 м

$H = 750$ мм = 0,75 м

За ГОСТ 6533-78 [75], згідно зі значенням внутрішнього діаметру, задаємося наступними параметрами:

- Висота еліптичної частини днища:

$h_{ел} = 0,25 \cdot D_{вн}$

$h_{ел} = 0,25 \cdot 0,7 = 0,175$ м

- Висота основи еліптичного днища:

$h_{осн} = 40$ мм = 0,04 м

- Внутрішня поверхня еліптичного днища:

$F = 0,62$ м²

- Товщина стінки еліптичного днища:

$s = 20$ мм = 0,02 м

- Об'єм еліптичного днища:

$V = 60,1$ дм³ = 0,0601 м³

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						96
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- Повна висота днища:

$$h_{\text{дн}} = h_{\text{ел}} + h_{\text{осн}}$$

$$h_{\text{дн}} = 0,175 + 0,04 = 0,215 \text{ м}$$

Повний об'єм циліндричної частини:

$$V = V_{\text{ц}} + 2V_{\text{дн}} \Rightarrow V_{\text{ц}} = V - 2V_{\text{дн}}$$

$$V_{\text{ц}} = 0,25 - 2 \cdot 0,0601 = 0,1298 \text{ м}^3$$

Висота циліндричної частини:

$$H_{\text{ц}} = V_{\text{ц}} / F = V_{\text{ц}} \cdot 4 / \pi \cdot D_{\text{вн}}^2$$

$$H_{\text{ц}} = 0,1298 \cdot 4 / 3,14 \cdot 0,7^2 = 0,337 \text{ м}$$

Загальна висота апарату:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2h_{\text{дн}}$$

$$H_{\text{заг}} = 0,337 + 2 \cdot 0,215 = 0,767 \text{ м}$$

5.2.2 Тепловий розрахунок

1. Внутрішній діаметр ферментера, $D = 0,7 \text{ м}$
2. Внутрішній діаметр сорочки ферментера, $D_1 = 0,9 \text{ м}$
3. Товщина стінки ферментера, $S = 0,04 \text{ м}$
4. Діаметр мішалки, $d_{\text{м}} = 0,18 \text{ м}$
5. Тип перемішуючого пристрою – турбінна відкрита мішалка
6. Число обертів мішалки, $n = 5,42 \text{ с}^{-1}$
7. Коефіцієнт заповнення, $K_z = 0,6$
8. Об'єм апарату:
 - Номінальний – $0,25 \text{ м}^3$;
 - Робочий – $0,15 \text{ м}^3$.
9. Температура середовища:
 - Культурального (в середині ферментера), $t_{\text{к}} = 37^\circ\text{C}$
 - На вході в сорочку, $t_1 = 25^\circ\text{C}$
 - На виході з сорочки, $t_2 = 32^\circ\text{C}$

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		97

10. Час культивування – 33 год

11. Основними компонентами поживного середовища є казеїновий гідролізат і глюкоза, тому тепловий ефект будемо розраховувати за ними. Вміст казеїнового гідролізату: 0,8%об від об'єму поживного середовища, вміст глюкози: 1,1%об від об'єму поживного середовища.

12. Кількість посівного матеріалу - 10% від об'єму заповнення ферментера: $V_{\text{пм}} = 0,15 \cdot 0,1 = 0,015 \text{ м}^3$

13. Кількість поживного середовища: $V_{\text{пс}} = V_{\text{р}} - V_{\text{пм}} = 0,15 - 0,015 = 0,135 \text{ м}^3$.

14. Густина середовища: $\rho_{\text{пс}} = 1540 \text{ кг/м}^3$ (по глюкозі)

15. Динамічна в'язкість середовища: $\mu_{\text{пс}} = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$

16. Теплоємність середовища, при $t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $c_1 = 1257 \text{ Дж/(кг} \cdot \text{K)}$

17. Коефіцієнт теплопровідності культури при $t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_1 = 0,57 \text{ Вт/(м} \cdot \text{K)}$

18. Маса поживного середовища: $m = V_{\text{пс}} \cdot \rho_{\text{пс}} = 0,15 \cdot 1540 = 231 \text{ кг}$

19. Маса компонентів ПС (казеїнового гідролізату і глюкози):

$m_{\text{кг}} = 1,2 \text{ кг};$

$m_{\text{г}} = 1,65 \text{ кг}.$

20. Значення середньої температури води в сорочці, $t_{\text{ср}} = 28,5 \text{ }^\circ\text{C}$

21. Густина води при середній температурі води, $\rho_2 = 996 \text{ кг/м}^3$

22. Кінематична в'язкість води при середній температурі, $\nu_2 = 0,85 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$

23. Теплоємність води при середній температурі, $c_2 = 4176 \text{ Дж/(кг} \cdot \text{K)}$

24. Коефіцієнт динамічної в'язкості води при середній температурі, $\mu_2 = 0,85 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$

25. Теплопровідність води при середній температурі води, $\lambda_2 = 61,5 \cdot 10^{-2} \text{ Вт/м} \cdot \text{K}$

26. Коефіцієнт теплопровідності стінки $\lambda_{\text{ст}} = 58,15 \text{ Вт/м} \cdot \text{K}$

Визначення кількості тепла, що виділяється в процесі розвитку культури мікроорганізмів.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		98

Для спрощення розрахунків приймаємо, що тепловиділення протягом всього часу культивування відбувається рівномірно, тоді кількість теплоти, що виділяється культурою: $Q = \frac{m}{1800} \cdot \frac{q}{\tau_k}$, Вт

В процесі гідролізу із 1 моль глюкози виділяється 2820 кДж, а з 1 моль казеїнового гідролізату 8570,5 кДж. Маса 1 моль глюкози – 0,180 кг, маса 1 моль казеїнового гідролізату – 2,042 кг.

Тепловиділення:

глюкози $2820/0,180 = 15666,7$ кДж/кг

казеїнового гідролізату $8570,5/2,042 = 4196,85$ кДж/кг

загальне: $15666,7 + 4196,85 = 19863,53$ кДж/кг

$$Q_c = \frac{2,85}{1800} \cdot \frac{19863,53 \cdot 10^3}{33 \cdot 3600} = 167,2 \text{ Вт}$$

Визначення кількості охолоджуючої води. Для уникнення перегріву середовища тепло, що виділяється, відводять. Тепло відводять охолоджуючою водою, повітрям, а також через втрати в навколишнє середовище.

Тепловий баланс ферментера:

$$Q_1 = Q_{\text{вод}} + Q_{\text{пов}} + Q_{\text{вт}}$$

де Q_1 – кількість теплоти, що виділяється біомасою; $Q_{\text{вод}}$ – кількість теплоти, що відводиться охолоджуючою водою; $Q_{\text{пов}}$ – тепло, що відводиться повітрям (в розрахунках можна не враховувати, так як його величина незначна, оскільки повітря, що йде на аерацію, подається в апарат з температурою, близькою до температури середовища) $Q_{\text{вт}}$ – втрати тепла в навколишнє середовище.

Втрати тепла в навколишнє середовище приймаємо рівними 2% від Q_1 :

$$Q_{\text{вт}} = Q_1 \cdot 0,02 = 167,2 \cdot 0,02 = 3,34 \text{ Вт}$$

Тепло, що відводиться водою:

$$Q_{\text{вод}} = Q_1 - Q_{\text{вт}} = 167,2 - 3,34 = 163,86 \text{ Вт}$$

Витрати води для відводу тепла:

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						99
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$G_{\text{вод}} = \frac{Q_{\text{вод}}}{c(t_2 - t_1)} = \frac{163,86}{4176(32 - 25)} = 0,005 \text{ кг/с}$$

Визначення площі поверхні охолодження ферментера.

$$F = \frac{Q_{\text{вод}}}{k \Delta t_{\text{ср}}}$$

де k – коефіцієнт теплопередачі від середовища в ферментері до води в сорочці;

$\Delta t_{\text{ср}}$ – середня різниця температур теплоносіїв.

Розрахуємо коефіцієнт тепловіддачі від рідини, що переміщується, до стінки. Для апаратів з сорочками при перемішуванні мішалкою коефіцієнт тепловіддачі від середовища, що переміщується, до стінки визначають з рівняння:

$$Nu_1 = 0,36 Re_1^{0,67} Pr^{0,33} (\mu_1 / \mu_c)^{0,14}$$

де Re – критерій Рейнольдса, що характеризує співвідношення сил інерції та молекулярного тертя в потоці; Pr – критерій Прандтля, що характеризує фізичні властивості потоку, μ_1 та μ_c – динамічна в'язкість середовища при середній температурі рідини та при температурі стінки, відповідно, так як різниця між ними не суттєва, приймаємо їх однаковими: $\mu_1 = \mu_c$

Критерій Нуссельта, що характеризує інтенсивність тепловіддачі на межі потік – стінка:

$$Nu_1 = \frac{\alpha_1 D}{\lambda}$$

де α_1 - коефіцієнт тепловіддачі від рідини, що переміщується, до стінки

$$Re = \frac{\rho n d^2}{\mu_1} = \frac{1540 \cdot 5,2 \cdot 0,18^2}{1,8 \cdot 10^{-3}} = 1441440$$

$$Pr = \frac{\mu_1 \cdot c_1}{\lambda_1} = \frac{1,8 \cdot 10^{-3} \cdot 1257}{0,57} = 3,97$$

Підставляємо отримані значення в формулу

$$Nu_1 = 0,36 \cdot 1441440^{0,67} \cdot 3,97^{0,33} \left(\frac{1,8 \cdot 10^{-3}}{1,8 \cdot 10^{-3}} \right)^{0,14} = 7590,97$$

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		100

$$\alpha_1 = \frac{7590,97 \cdot 0,57}{0,7} = 6181,22 \text{ Вт/(м}^2 \cdot \text{К)}$$

Розрахуємо коефіцієнт тепловіддачі від стінки до охолоджуючої рідини:

$$\alpha_2 = 0,023 \frac{\lambda_2}{D+2s} \left(\frac{D_1}{D_1-(D+2s)} \right)^{0,45} \left(\frac{W_B(D+2s)}{V_2} \right)^{0,8} \left(\frac{\mu_2 c_2}{\lambda_2} \right)^{0,43}$$

Швидкість води в сорочці ферментера:

$$W_2 = \frac{G_B}{\rho 2f}$$

де f – площа перетину сорочки:

$$f = 0,785 (D_1^2 - (D + 2s)^2)$$

$$f = 0,785 (0,8^2 - (0,7+2 \cdot 0,004)^2) = 0,158 \text{ м}^2$$

Тоді швидкість води:

$$W_B = \frac{0,0056}{998 \cdot 0,158} = 3,55 \cdot 10^{-5} \text{ м/с}$$

Середня температура води:

$$t_{\text{сер}} = \frac{t_1+t_2}{2} = \frac{32+25}{2} = 28,5^\circ\text{C}$$

За формулою розрахуємо значення коефіцієнта тепловіддачі від стінки до охолоджуючої рідини:

$$\alpha_2 = 0,023 \frac{0,595}{(0,7+2 \cdot 0,004)} \left(\frac{0,9}{0,9-(0,7+2 \cdot 0,004)} \right)^{0,45} \left(\frac{0,0035(0,7+2 \cdot 0,004)}{0,85 \cdot 10^{-6}} \right)^{0,8} \cdot \left(\frac{0,85 \cdot 10^{-3} \cdot 4176}{0,595} \right)^{0,43} = 0,023 \cdot 0,869 \cdot 2,004 \cdot 6093,06 \cdot 2,155 = 525,93$$

Вт/(м²·К)

Коефіцієнт теплопередачі від середовища в ферментері до охолоджуючої рідини:

$$k_m = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_2}} = \frac{1}{\frac{1}{6181,22} + \frac{0,004}{58,15} + \frac{1}{525,93}} = \frac{1}{1,62 \cdot 10^{-4} + 6,88 \cdot 10^{-5} + 0,0019} = 469,05 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К}$$

З урахуванням забруднень стінок:

$$k = k_m \cdot 0,95 = 469,05 \cdot 0,95 = 445,6 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К}$$

Площа поверхні теплообміну:

$$F = \frac{163,86}{445,6 \cdot 7} = 0,052 \text{ м}^2$$

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		101

Дійсна поверхня теплообміну:

$$F_d = \pi D H_c$$

$$H_c = 4V_p / \pi D, F_d = 4V_p = 4 \cdot 0,15 = 0,6 \text{ м}^2.$$

Умова теплообміну виконується, оскільки: $F < F_d$.

5.2.3 Розрахунок перемішуючого пристрою

Для процесу культивування біомаси для отримання Біоспорину найкраще підходить турбінна мішалка:

$$D = 0,7 \text{ м}$$

$$d_m = D/4 = 0,7/4 = 0,175 \text{ м}$$

Серед представлених мішалок стандартного ряду за турбінних мішалок за ГОСТ 20680-75, наявна мішалка, діаметром 180 мм.

Повинні зберігатись основні параметри даної мішалки:

$$- D/d_m = 3 \div 4;$$

$$- h_m/d_m = 0,2;$$

$$- h/d_m = 0,4 \div 1;$$

$$- l/d_m = 0,25;$$

$$- b/d_m = 0,1.$$

Геометричні розміри мішалки:

$$- \text{Висота мішалки: } h_m = d_m \cdot 0,2 = 0,18 \cdot 0,2 = 0,036 \text{ м}$$

- Висота розміщення перемішуючого пристрою над днищем апарату:

$$h = d_m \cdot 0,6 = 0,18 \cdot 0,6 = 0,108 \text{ м}$$

$$- \text{Ширина лопасті: } l = d_m \cdot 0,25 = 0,18 \cdot 0,25 = 0,045 \text{ м}$$

$$- \text{Товщина відбивної перегородки: } b = d_m \cdot 0,1 = 0,18 \cdot 0,1 = 0,018 \text{ м}$$

Окружна швидкість $w = 2,5 \text{ м/с}$. Приймаємо $w = 3 \text{ м/с}$.

$$\text{Частота обертання: } n = w / \pi d_m = 3 / 3,14 \cdot 0,18 = 5,2 \text{ с}^{-1}$$

Діаметр вала мішалки:

$$d_b = C \cdot d_m$$

де $C = 0,117$ – для турбінної мішалки

$$d_b = 0,117 \cdot 0,18 = 0,02106 \text{ м}$$

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		102

Потужність, що витрачається на подолання тертя в торцевих ущільненнях:

$$N_{\text{ущ}} = 6020 \cdot d_b^{1,3} = 6020 \cdot 0,02106^{1,3} = 39,82 \text{ Вт}$$

В залежності від $Re_{\text{перем}}$ задаємось критерієм K_N – критерій потужності, за графіком нормалі знаходимо значення $K_N = f(Re_n)$ для турбінної мішалки: $K_N=6$ [76].

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_N \cdot \rho \cdot n^3 \cdot d_m^5 = 6 \cdot 1540 \cdot 5,2^3 \cdot 0,18^5 = 245,5 \text{ Вт}$$

Коефіцієнт висоти рівня рідини: $k_n = 1,5$

Потужність електродвигуна:

$$N = \frac{k_n \cdot k_n \cdot N + N_{\text{ущ}}}{\eta}$$

де k_n – коефіцієнт, що враховує наявність внутрішніх пристроїв в апараті, для апаратів с перегородками $k_n = 1$.

$$N = \frac{1 \cdot 1,5 \cdot 245,5 + 39,82}{0,45} = 906,8 \text{ Вт}$$

Обираємо стандартний двигун потужністю 1 кВт.

5.2.4 Розрахунок барботеру

Висота перемішуючого пристрою над барботером становить:

$$h_6 = 0,25d_m = 0,25 \cdot 0,18 = 0,45 \text{ м}$$

Діаметр барботеру:

$$D_6 = (0,5 \div 0,75) \cdot d_m = 0,75 \cdot 0,18 = 0,135 \text{ м}$$

Діаметр отворів барботеру:

$$d_0 = 2 \text{ мм} = 0,002 \text{ м}$$

Кількість отворів у барботері:

$$Z_{\text{отв}} = (4V_r) / (\pi d_0^2 W_0)$$

Де $V_r = 0,003 \text{ м}^3/\text{с}$ – витрата стерильного аераційного повітря.

Приймаємо швидкість руху повітря $W_0=20 \text{ м/с}$, тоді:

$$Z_{\text{отв}} = (4 \cdot 0,003) / (3,14 \cdot 0,002^2 \cdot 20) = 48 \text{ отворів}$$

Відстані між отворами:

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						103
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$t_{\text{отв1}} = (\pi D_6) / Z_{\text{отв}} = (3,14 \cdot 0,135) / 48 = 0,009 \text{ м}$$

Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера:

$$S_{\text{отв}} = (\pi d_0^2 Z_{\text{отв}}) / 4 = (3,14 \cdot 0,002^2 \cdot 48) / 4 = 1,51 \cdot 10^{-4} \text{ м}^2$$

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Для нормального, стабільного функціонування ферментеру необхідно здійснювати ряд операцій, а саме подавати середовище у ферментер, теплоагент в сорочку, перемішувати, подавати повітря в реактор. Для ефективності виробництва необхідно здійснити правильний вибір обладнання.

Подача води в сорочку для охолодження може здійснюватись електронасосом. Для вибору електронасоса необхідно зробити наступні розрахунки.

1. Потужність, що витрачається на перекачування води:

$N_n = G_{\text{вод}} \cdot H \cdot g$, де $G_{\text{вод}}$ – витрати води для відводу тепла, кг/с, H – напір, м (приймаємо за 10), g – прискорення вільного падіння, м/с².

$$N_n = 0,032 \cdot 10 \cdot 9,81 = 3,14 \text{ Вт}$$

2. Потужність електродвигуна:

$N_e = N_n / \eta \cdot \eta_{\text{пер}}$, де η – ККД насоса (0,25), $\eta_{\text{пер}}$ – коефіцієнт корисної дії передачі (1).

$$N_e = 0,011 / 0,25 \cdot 1 = 12,56 \text{ Вт}$$

Згідно обрахованих даних і ГОСТ 20791-88 [77] обираємо електронасос центробіжний герметичний ЦГ6,3/12,5. Завдяки своїй конструкції, такі насоси не допускають можливості інфікування середовища. Крім того, підшипники змазуються рідиною, яка перекачується, завдяки чому не забруднюються матеріалом для змазування. Згідно розрахунків обрано редуктор ВД-IV 7/48 4500 та електродвигун АИР100S2.

На підприємстві необхідно створити надійну систему вентиляції та пневмотранспорту. Для забезпечення переміщення повітряних мас та інших

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						104
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

газових сумішей, що є неагресивним агентом по відношенню вуглеводневої сталі трубопроводу обираємо радіальні вентилятори ВЦ 14-46 (ВР 280-46), що забезпечують переміщення повітряних мас и других газоподібних сумішей, температура яких не перевищує +80°C. Продуктивність даного вентилятора становить 18000 м³/год.

На підприємствах 80-90% води йде на охолодження технологічного обладнання. Для охолодження апаратури проектується систему зворотного водопостачання. Охолодження відпрацьованої, теплої, умовно чистої води відбувається у градирнях за рахунок часткового випарювання під час контакту зі струмом повітря [78].

Для підготовки води очищеної використовують систему для очистки води Milli RX-20 або EPRO-450. Дана установка забезпечує очистку води для таких потреб, як: приготування поживних середовищ в мікробіології, приготування якісних буферів, розчинів хімічних та біохімічних реагентів, забезпечує роботу деяких типів лабораторного обладнання (кліматичних камер, автоклавів та ін.), для подальшої очистки води. Продуктивність даної установки становить 75 л/год.

Важливе значення має система очистки повітря. Повітря, що поступає у чисті приміщення, в яких відбуваються технологічні операції має важливе значення та впливає на властивості продукції, що випускається. Для відповідної очистки повітря для класів чистоти приміщень В, С, D обираємо фільтри грубої та тонкої очистки повітря. Очистка повітря для виробничих приміщень забезпечують фільтри HEPA і ULRA. Прилади подібного типу здатні затримувати до 99,99% найдрібніших мікрочастинок розміром до 0,3 мкм, чим забезпечують найкращі показники чистоти повітря. Ще одним функціональним завданням даного обладнання є підтримка мікроклімату в певних параметрах. Це досягається застосуванням в фільтроблоках контролерів, які регулюють стан і показники повітряних потоків.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		105

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

До апаратів з перемішувочними пристроями виносяться наступні вимоги безпеки:

- Для забезпечення безпеки експлуатації апарати повинні відповідати вимогам ГОСТ 12.2.003 та ГОСТ 12.2.007, а також документам, що складаються на кожен апарат конкретного типу. Апарати, що працюють за надлишкового тиску, повинні відповідати вимогам ПБ 10-115-97;

- Персонал, що обслуговує той чи інший апарат, повинен бути захищений від впливу таких шкідливих та небезпечних факторів як підвищений тиск середовища в апараті, підвищена вібрація та шум, зіткнення з рухомими та гарячими частинами апаратів, небезпечного значення електричного струму та високих потенціалів статичної електрики, вибухів, загорянь;

- Апарати мають бути герметичні відносно зовнішнього середовища. Ступінь герметичності, а також методи її дослідження визначаються згідно ГОСТ 26-11-14;

- На апаратах, що вміщують невибухонебезпечні речовини і речовини, що віднесені до 4 класу безпеки по ГОСТ 12.1.007(речовини малонебезпечні), допустиме використання одинарних торцевих сальникових ущільнювачів і гідрозатворів;

- Корпуси апаратів та їх зйомні одиниці, що працюють в умовах надлишкового тиску, мають бути захищені від надмірного підвищення тиску запобіжниками – пружинними клапанами прямої дії, або запобіжними мембранами, які встановлюються прямо на апараті, чи трубопроводі, який під'єднаний до апарату;

- Вибір електрообладнання треба здійснювати згідно з вимогами «Правила влаштування електроустановок. Вид. 6-е, 1986»., а заземлення повинне відповідати вимогам ГОСТ 12.1.030, ГОСТ 12.1.038, ГОСТ 12.2.007.0 [79].

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						106
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- Температура зовнішніх поверхонь апаратів, термоізоляційних покриттів, які можуть знаходитись у прямому контакті з робочими місцями і обслуговуючим персоналом, має бути не більше 45°C при установці апарата всередині приміщення, і не більше 60°C при встановленні апаратів ззовні.

Будь-які роботи, що проводяться з апаратами на промисловості мають відповідати всім вимогам, наведеним у «ССБТ. Процессы производственные. Общие требования безопасности» та ГОСТ 121004-91 [80].

Норми перевіряються за наступними параметрами:

- рівень шуму і вібрацій;

- освітленість робочого місця;

- запиленість приміщення;

- загазованість приміщення;

- фізичні характеристики;

- вміст шкідливих речовин за ГДК, які вказані у ГОСТ 12.1.005-88 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

На будь-якому біотехнологічному підприємстві повинна регулярно проводитись комплексна профілактика, яка включає в себе вдосконалення технологічного обладнання, ефективну роботу вентиляційної системи, забезпечення герметичності обладнання, перевірка якості переробки відходів і максимальна мінімізація відходів.

Проводиться регулярний обов'язковий лабораторний контроль вмісту шкідливих хімічних речовин у повітрі робочої зони. Їх кількість не повинна перевищувати вказані регламентовані норми. Особливе місце займає боротьба із шумом та вібрацією. Використовуються спеціальні протишумові, віброгасильні пристрої і матеріали, правильне планування виробничих приміщень, шумопоглинальні будівельні матеріали. Також працівники забезпечуються індивідуальними засобами захисту. Працівникам грамотно komponують робочий день, поєднуючи час праці і відпочинку.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		107

Основними несприятливими факторами біотехнологічних виробництв, особливо підприємств з випуску білково-вітамінних концентратів і ферментних препаратів, є живі і мертві мікроорганізми, продукти їх життєдіяльності, пил білка, а також хімічно активні речовини, що надходять до органів дихання у вигляді аерозолів, або забруднюючи відкриті ділянки тіла.

Щоб попередити забруднення атмосфери використовують герметизацію виробничих апаратів, а також використовують такі очисні прилади, як циклони, гідроциклони, пилоосаджуючі камери, тканинні і електричні фільтри, скрубери.

Важливою також є стерилізація стічних вод, адже вони можуть містити живу мікрофлору та шкідливі продукти життєдіяльності мікроорганізмів. Спосіб очистки обирається на основі аналізу складу стічних вод.

Забрудненість стічних вод оцінюється зазвичай двома показниками:

- 1) хімічним поглинанням кисню (ХПК) – кількістю кисню (мг), якої досить для повного хімічного окислення всіх забруднень в 1 л стоку;
- 2) біологічним поглинанням кисню (БПК) – кількістю кисню (мг), яке споживається мікроорганізмами для окислення органічних речовин в 1 л стоку.

В промислових умовах спочатку стічні води механічно очищують, після цього проциджують крізь стоки, відфільтровують, відстоюють, обробляють у гідроциклонах, проводять флотацію до того моменту, доки ступінь очистки не досягне значення 50-70%. В кінці до води можуть застосовуватися такі види очистки як оброблення вапном, хлорування та озонування. Завдяки цьому досягається ступінь очистки 80-90%. Також, замість хімічного способу, можна застосовувати фізико – хімічний, із використанням адсорбентів. Є процеси, в основі яких лежить ультрафільтрація, зворотній осмос і дистиляція. Такі види очищення забезпечують ступінь очистки 90 – 95% [81].

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		108

Відпрацьоване повітря перед надходженням в атмосферу чистять за допомогою сітчастих фільтрів. Повітря, що проходить крізь фільтр, звільняється від частинок культуральної рідини з мікроорганізмами. Ефективність такої очистки складає 99,6%.

					ДП 6221 00.000 ПЗ	Арк.
						109
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВКИ

1. У проєкті для виробництва двоштамового пробіотичного препарату Біоспорин обрано продуценти *Bacillus subtilis* 3/Re, *Bacillus licheniformis* 31/Re із підвищеною антибіотикорезистентністю.

2. Було визначено, що, незважаючи на близькі морфологічні, фізіолого-біохімічні ознаки до штамів-продуцентів оригінального складу препарату Біоспорин (*Bacillus subtilis* 3, *Bacillus licheniformis* 31), *Bacillus subtilis* 3/Re та *Bacillus licheniformis* 31/ Re, у пропорції на одну дозу препарату $10 \cdot 10^9$ та $1,6 \cdot 10^9$ КУО/мл відповідно, проявляють кращу антагоністичну активність до патогенної та умовно-патогенної мікрофлори кишківника.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуцентів *Bacillus subtilis* 3/Re, *Bacillus licheniformis* 31/Re обрано склад поживного середовища для виробничого культивування на основі кислотного гідролізату казеїну та кукурудзяного екстракту, а також визначені оптимальні параметри для культивування (для *B.licheniformis* 31/Re в дужках): температура $37 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,0 \pm 0,5$, перемішування при 325 (500) об/хв, тривалість 26-33 год, аерація 0,7 (0,4) $V_{\text{пов}}/V_{\text{ПС}}$.

4. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів антибіотиків та запропоновано схему отримання продуценту шляхом штучного добору за дії поступового підвищення концентрації антибіотиків при послідовних пересівах.

5. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для його отримання в процесі культивування обрано і розраховано конструкцію виробничого ферментера для культивування *B.subtilis* 3/Re об'ємом $0,25 \text{ м}^3$, що дозволяє отримати культуральну рідину належної якості, зокрема необхідної концентрації КУО (концентрація живих

					ДП 6221. 00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВКИ		
Розробив		Щердина В.Ю.					
Консульт.							
Керівник		Яловенко О.І.					
Затвер.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	110	120
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

клітин або спор $10 \cdot 10^9$ КУО/мл) .

6. Запропоновано склад поживного середовища на основі кислотного гідролізату казеїну та кукурудзяного екстракту, що обумовлює значний ріст культури продуцента, а також підвищує антагоністичну активність даного препарату.

7. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва пробіотичного препарату Біоспорин в якості харчової добавки у флаконах.

					ДП 6221. 00.000 ПЗ	Арк.
						111
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010; 90: 859-904.
2. Лях В. Р., Червецова В. Г., Кричківська А. М. Пробиотики як сучасні превентивні препарати захворювань шлунково-кишкового тракту // *Chemistry, Technology and Application of Substance.* – 2018. – Т. 1. – №. 1. – С. 72-77.
3. Гордиенко П.А., Чуешов В.И., Гордиенко А.Д., Кудокоцева Е.В. Научное обоснование создания новых лекарственных форм пробиотиков (обзор литературы и результаты собственных экспериментов) // *Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация.* 2015. №22 (219).
4. Хиштова Н.С. Иммунобиологические препараты для профилактики и лечения инфекционных заболеваний и коррекции дисбиозов: учебное пособие / Н.С.Хиштова.- Майкоп: 2007.- 76 с.
5. Овчаренко Л.С., Вертегел А.О., Андрієнко Т.Г., Самохін І.В., Кряжев О.В., Шелудько Д.М., Слущка Т.В. Мировой опыт использования спорообразующих бацилл для лечения и профилактики пищевой аллергии у детей // *ЗР.* 2017. №3.
6. Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73(3), 203-266. doi:10.1017/S0006323198005167
7. Определитель бактерий Берджи: В 2 т.: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крена, П. Снита и др. – М.: Мир, 1997.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания ОФС.1.7.1.0009.15 Споровые пробиотики
9. Jers C, Kobir A, Søndergaard EO, Jensen PR, Mijakovic I. *Bacillus subtilis* two-component system sensory kinase DegS is regulated by serine

					<i>ДП 6221. 00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>		<i>Щердина В.Ю.</i>			<i>СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ</i>		
<i>Консульт.</i>							
<i>Керівник</i>		<i>Яловенко О.І.</i>					
<i>Затвер.</i>							
						<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>
						<i>Д</i>	<i>112</i>
							<i>Аркушів</i>
							<i>120</i>
						<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського</i>	
						<i>ФБТ</i>	

phosphorylation in its input domain. PLoS One. 2011; 6(2): e14653.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014653>

10. Abriat C. et al. Microbiological and real-time mechanical analysis of *Bacillus licheniformis* and *Pseudomonas fluorescens* dual-species biofilm //Microbiology. – 2019. – Т. 165. – №. 7. – С. 747-756.

11. Schaechter M. et al. Microbe. – ASM press, 2006.

12. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. (2004) The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7(4):204-211.

13. Setlow P. (2014). Spore resistance properties. Microbiol. Spectr. 2014 Oct;2(5), 1–14. doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012

14. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals //Journal of applied microbiology. – 2006. – Т. 101. – №. 3. – С. 514-525.

15. Petrackova D. et al. Long-term adaptation of *Bacillus subtilis* 168 to extreme pH affects chemical and physical properties of the cellular membrane //Journal of Membrane Biology. – 2010. – Т. 233. – №. 1-3. – С. 73-83.

16. Belda E et al., "An updated metabolic view of the *Bacillus subtilis* 168 genome.", Microbiology, 2013 Apr;159(Pt 4):757-770

17. Dong Z. et al. Exploring the Metabolomic Responses of *Bacillus licheniformis* to Temperature Stress by Gas Chromatography/Mass Spectrometry //Journal of microbiology and biotechnology. – 2018. – Т. 28. – №. 3. – С. 473-481.

18. Snoke J.E. and Cornell N. Protoplast Lysis and Inhibition of Growth of *Bacillus licheniformis* by Bacitracin. J Bacteriol. 1965 February; 89(2): 415–420.

19. Seifan M., Samani A. K., Berenjian A. New insights into the role of pH and aeration in the bacterial production of calcium carbonate (CaCO₃)

					ДП 6221.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		113

//Applied microbiology and biotechnology. – 2017. – Т. 101. – №. 8. – С. 3131-3142.

20. Технологія пробіотиків: Підруч. / С.О. Старовойтова, О.І. Скроцька, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. — К.: НУХТ, 2012. — 318 с.

21. Лиморенко А.П. Разработка технологии глубинного способа культивирования микроорганизмов *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* для производства пробиотиков: Дис.докт.биол.наук: 03.00.23. – Москва, 2002.

22. Пат. RU2219238C1 Російська Федерація. Штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, используемые для профилактики и лечения инфекционных болезней и дисбиозов и биопрепарат биспорин для профилактики и лечения инфекционных болезней и дисбиозов / И.Б. Сорокулова, В.В. Смирнов, И.Г. Осипова, А.О. Прудников, дата публикации: 20.12.2003

23. Федорова О.В., Юнусова З.С., Шурбина М.Ю., Валеева Р.Т. Пробиотические препараты: характеристика, критерии, требования к ним // Вестник Казанского технологического университета. 2016. №7.

24. de Boer AS, Diderichsen B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. Amyloliquefaciens*: A review. Appl Microbiol Biotechnol 1991;36(1):1–4. Crossref, Medline, Google Scholar

25. de Boer AS, Priest F, Diderichsen B. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*—A review. Appl Microbiol Biotechnol 1994;40(5):595–598. Crossref, Google Scholar

26. Похиленко В. Д., Перельгин В. В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их спорообразующих бактерий и их безопасность //Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – №. 2-3. – С. 20-41.

27. Morikawa, M. "Beneficial Biofilm Formation by Industrial Bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species". Journal of Bioscience and Bioengineering. 2006; Vol.101, No.1, 1-8.

					ДП 6221. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		114

28. Salkinoja-Salonen S., Vuorio R., Andersson M.A., Kämpfer P., Andersson M.C., Honkanen-Buzalski T., and Scoging A.C. Toxigenic Strains of *Bacillus licheniformis* Related to Food Poisoning. *Appl Environ Microbiol.* 1999 October; 65(10): 4637–4645.

29. Hong HA, Khaneja R, Tam NM, Cazzato A, Tan S, Urdaci M, Brisson A, Gasbarrini A, Barnes I, Cutting SM (March 2009). "Bacillus subtilis isolated from the human gastrointestinal tract". *Research in Microbiology.* 160 (2): 134–43. doi:10.1016/j.resmic.2008.11.002

30. Калініченко С. В. Сучасні напрямки створення та удосконалення пробіотиків / С. В. Калініченко, О. О. Коротких, І. Ю. Тіщенко // Український біофармацевтичний журнал. - 2016. - № 1. - С. 4-10.

31. Технологічні аспекти одержання пробіотиків / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Ю. М. Дорошко // Наукові праці НУХТ. - 2014. - Т. 20, № 4. - С. 69-77.

32. Skrypnyk, I. N. Modern sporeforming probiotics in clinical practice / I.N. Skrypnyk, G.S. Maslova // *Modern gastroenterology.* – 2009. - № 3 (47). – P. 81-90

33. Пат. 4641513/SU. Україна. Препарат Біоспорин для профілактики та лікування шлунково-кишкових захворювань людини, В.В.Смирнов, С.Р.Резник, И.Б.Сорокулова, В.А.Вьюницкая, А.Т.Слабоспицкая, Э.А.Берилло, И.Г.Скорикова, В.Я.Чаплинский и А.В.Тофан

34. Інструкція до споживання харчової добавки «Біоспорин» ТОВ «ФЗ «Біофарма».

35. Корсунська О. І., Нефьодов О. О. Імунотропні препарати у роботі лікаря загальної практики (фармакотерапевтичний довідник). – 2015.

36. Бережной В. В., Корнева В. В. Возможности и перспективы использования отечественного пробиотика на основе спорообразующих бактерий в педиатрической практике // *Современная педиатрия.* – 2015. – №. 7. – С. 43-50.

					ДП 6221. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		115

37. McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2012). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 33–44. doi:10.1038/nrmicro2921
38. Daniel RA, Errington J. Cloning, DNA sequence, functional analysis and transcriptional regulation of the genes encoding dipicolinic acid synthetase required for sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 1993;232:468–483. doi:10.1006/jmbi.1993.1403
39. Lysine biosynthesis – *Bacillus licheniformis* ATCC 14580: https://www.kegg.jp/keggbin/show_pathway?org_name=bli&mapno=00300&mapscale=&show_description=hide
40. Lysine biosynthesis - *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168: https://www.kegg.jp/keggbin/show_pathway?org_name=bsu&mapno=00300&scale=&orgs=&auto_image=&nocolor=&show_description=hide
41. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. – М.: Академия, 2003. – 430с.
42. Биологическая химия с упражнениями и задачами / Под ред. С. Е. Северина. — М.: Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2011. — 624 с.
43. Boumba V. A., Ziavrou K. S., Vougiouklakis T. Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses // *Forensic science international*. – 2008. – Т. 174. – №. 2-3. – С. 133-151.
44. Stewart GC. The Exosporium Layer of Bacterial Spores: a Connection to the Environment and the Infected Host. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015;79(4):437-457. doi:10.1128/MMBR.00050-15
45. Galperin M. Y. et al. Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia*: towards the minimal set of sporulation-specific genes // *Environmental microbiology*. – 2012. – Т. 14. – №. 11. – С. 2870-2890.
46. Сорокулова, И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых биопрепаратов // *Антибиотики и химиотерапия*. – 1996.– Т. 41, № 10. – С. 13–15.

					ДП 6221. 00.000 ПЗ	Арк.
Эм.	Арк.	№ докум.	Подпис	Дата		116

47. К.К. Стяжкин, А.Н. Забокрицкий, А.Г. Кильчевский, И.А. Поберий, А.А. Ильязов Биоспорин – пробиотик, перспективный для решения актуальных задач медицины в современных условиях, Вестник Российской Академии Естественных Наук, Выпуск №1/2006

48. Осипова, И.Г., Сорокулова, И.Б., Терешкина, Н.В., Григорьева, Л.В. Изучение безопасности бактерий рода *Bacillus*, составляющих основу некоторых пробиотиков // Ж. микробиол. – 1998. – № 6. – С. 68–70.

49. Kunst, F., et al. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 1997 November; 390, 249-256.

50. Kobayashi, K., et al. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 April 15; 100(8): 4678-4683.

51. Ara, K., et al. *Bacillus minimum* genome factory: effective utilization of microbial genome information. *Biotechnol. Appl. Biochem.*. 2007 March; 46(Pt 3):169-78.

52. Rey M.W., Ramaiya P., Nelson B.A., Brody-Karpin S.D., Zaretsky E.J., Tang M., Lopez de Leon A., Xiang H., Gusti V., Clausen I.G., Olsen P.B., Rasmussen M.D., Andersen J.T., Jorgensen P.L., Larsen T.S., Sorokin A., Bolotin A., Lapidus A., Galleron N., Ehrlich S.D., Berka R.M. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol*. 2004;5(10):R77. Epub 2004 Sep 13.

53. Barbe, V., et al. (2009). From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology*, 155(6), 1758–1775. doi:10.1099/mic.0.027839-0

54. Sauer, U. & Eikmanns, B. J. (2005). The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 29, 765–794

55. Sonenshein, A. L. (2007). Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 5, 917–927.

56. Danchin, A. (2009). A phylogenetic view of bacterial ribonucleases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 85, 1–41

					ДП 6221. 00.000 ПЗ	Арк.
Эм.	Арк.	№ докум.	Подпис	Дата		117

57. Sekowska, A., Kung, H. F. & Danchin, A. (2000). Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 145–177
58. Kiley, P. J. & Beinert, H. (2003). The role of Fe–S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6, 181–185
59. Wecke T, Veith B, Ehrenreich A, Mascher T. Cell envelope stress response in *Bacillus licheniformis*: integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network. *J Bacteriol.* 2006;188(21):7500-7511. doi:10.1128/JB.01110-06
60. Sonnenshein AL. *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics*. Washington: American Society for Microbiology; 1993
61. Alexander M. *Introduction to Soil Microbiology*. New York: John Wiley; 1977
62. Chen NY, Jiang SQ, Klein DA, Paulus H. Organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* diaminopimelate operon, a cluster of genes encoding the first three enzymes of diaminopimelate synthesis and dipicolinate synthase. *J. Biol. Chem.* 1993;268:9448–9465.
63. Takahashi F. et al. Increased dipicolinic acid production with an enhanced spoVF operon in *Bacillus subtilis* and medium optimization // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2015. – Т. 79. – №. 3. – С. 505-511.
64. Дехтяренко Н. В. Критерії відбору пробіотичних штамів мікроорганізмів / Н.В. Дехтяренко, Л.М. Шинкаренко, О.М. Дуган. // *Наукові записки. Т. 67 : Біологія та екологія / Нац. ун-т "Києво-Могилянська академія"* ; [редкол. тем. вип. : Замостьян В. П., Безусько А. Г., Великий М. М. ... та ін. ; упоряд. Ісаєв С. Д., Куниця Н. І. ; рец. Мельник В. І., Костерін С. О.]. - К. : Києво-Могилянська академія, 2007. - С. 30-36.
65. Munakata N. et al. Action spectra in ultraviolet wavelengths (150-250 nm) for inactivation and mutagenesis of *Bacillus subtilis* spores obtained with

synchrotron radiation //Photochemistry and photobiology. – 1986. – Т. 44. – №. 3. – С. 385-390.

66. Toya Y. et al. Enhanced dipicolinic acid production during the stationary phase in *Bacillus subtilis* by blocking acetoin synthesis //Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2015. – Т. 79. – №. 12. – С. 2073-2080.

67. Каталог штаммов Украинской коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, другие издания 2007 г.(выправлене і доповнене у 2014 г.) .

68. Основы генетической та клеточной инженерии. Ч. I. Генетическое конструирование *in vivo*: метод. указания до выполнения лабораторных работ для студентов специальности 162 «Биотехнологии та биоинженерия» / Уклад. : I.P. Клечак, Т.С. Тодосійчук, В.М. Ліновицька, Л.О. Тітова. – Киев : КПИ имени Игоря Сікорського, 2017. – 50 с.

69. Осипова И.Г. Экспериментально-клиническое изучение споровых пробиотиков: Автореф. дис.докт.биол.наук: 03.00.07. – Москва, 2006.

70. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

71. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий. – М.: Мир, 1984. – 560с.

72. Оборудование микробиологических производств / К. А. Калунянц, Л. И. Голгер, В. Е.Балашов // Москва, Агропроиздат, 1987. – 398 с.

73. Закоморний Д. М., Поводзинський В. М., Шибевський В. Ю. Класифікація та аналіз роботи ферментерів з механічними перемішувачами в аеробних процесах біотехнології // Технічні науки. Scientific Journal «ScienceRise». – 2015. №5/2(10). – С.24-27.

74. Беккер М. Е. Введение в биотехнологию. Пер. с латышского. – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 232 с.

75. ГОСТ 20680–86 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами вертикальные. Общие технические требования»

					ДП 6221. 00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		119

76. ГОСТ 6533–78 «Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов. Основные размеры»

77. Федосеев К. Г. Процессы и аппараты биотехнологии в химикофармацевтической промышленности / К.Г. Федосеев. – М.: Медицина, 1989.– 200 с.

78. ГОСТ 20791-83 «Электронасосы центробежные герметичные. Технические условия»

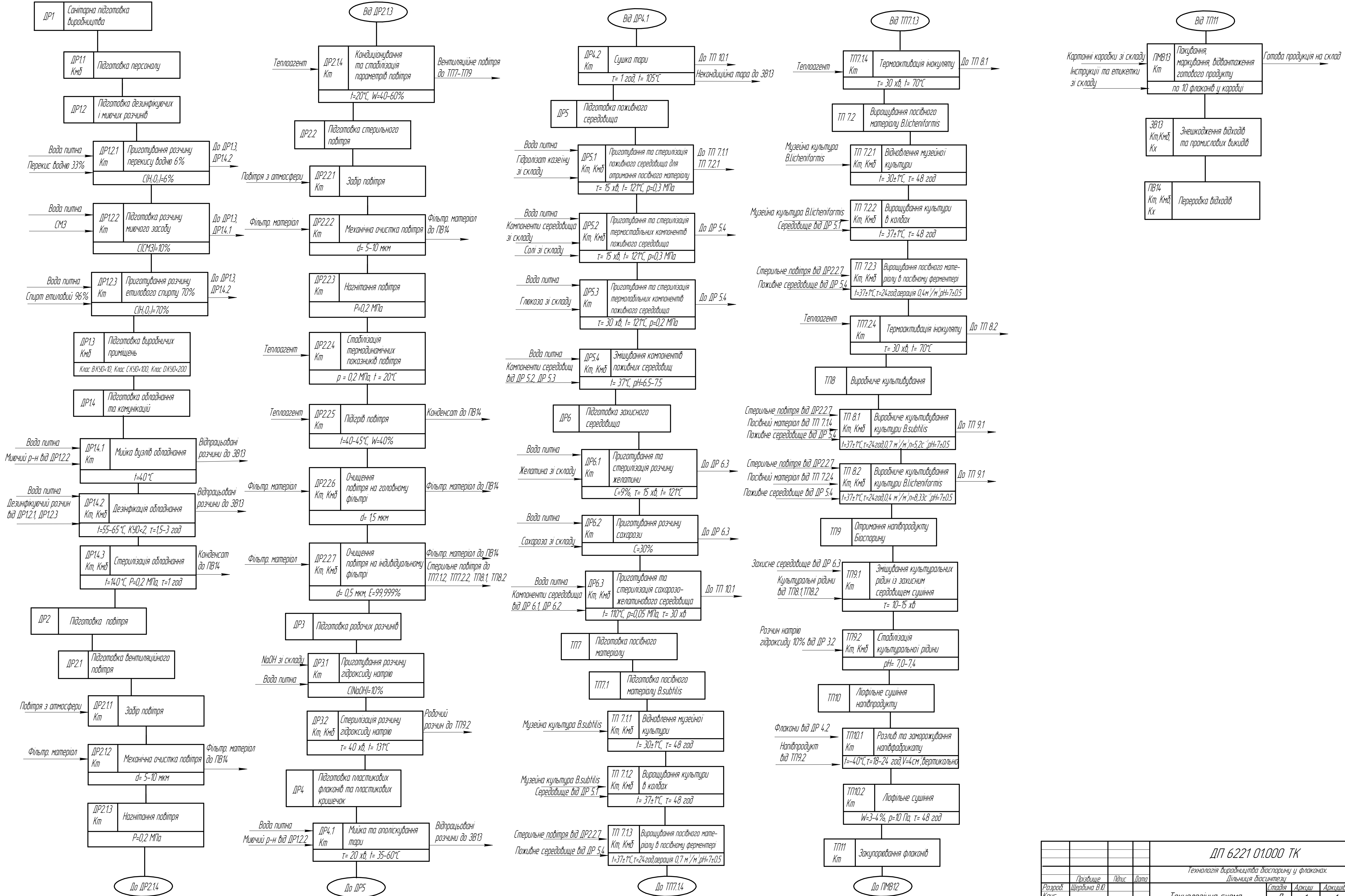
79. Конструирование и расчет химической аппаратуры: Справочник / А. А. Лашинский, А. Р. Толчинский. – СПб: Машиностроение, 1970. – 752 с.

80. Слесарев Ю.Н. Правила безопасности для производств микробиологической промышленности, 2-е изд., М. Недра. – 1980, 30 с.

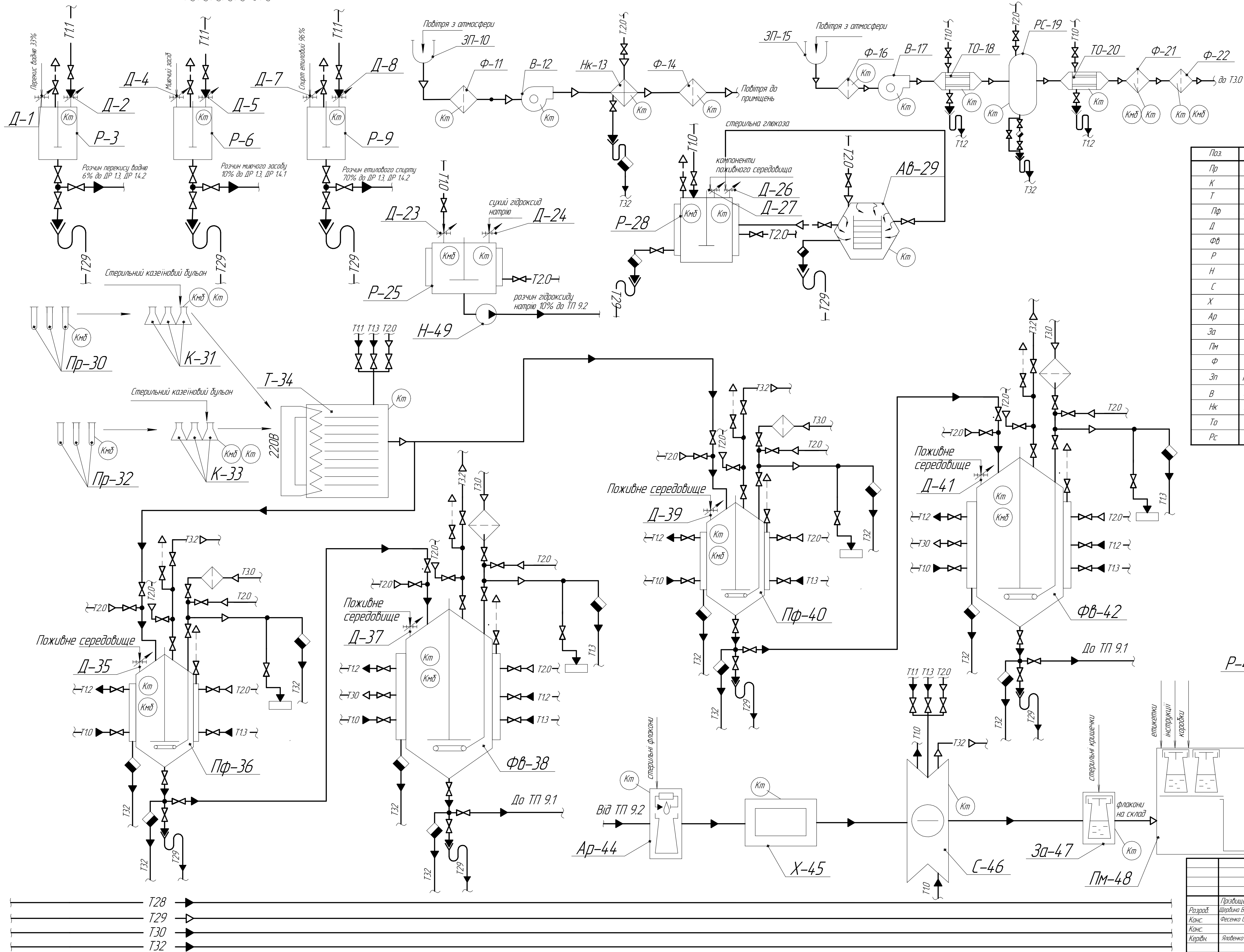
81. Основи охорони праці: Підручник. 2-ге видання, доповнене та перероблене/К.Н.Ткачук, М.О. Халімовський, В.В.Зацарний, Д.В.Зеркалов За ред. К.Н. Ткачука і М.О. Халімовського.-К.: Основа,2006. –С.234.

82. Макаров Г. В. «Охрана труда в химической промышленности», М.: Химия, 1989.

					ДП 6221. 00.000 ПЗ	Арк.
						120
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



ДП 6221 01000 ТК			
Технологія вирощування біоспори у флаконах. Дільниця біосинтезу			
Розроб.	Щербина В.В.	Підпис.	Дата.
Конс.			
Керівн.	Ялоденко О.І.		
Затв.			
Технологічна схема вирощування протидієчного препарату Біоспорин		Стадія	Аксис
		Д	1
		КП ім. Ігоря Скарського ФБТ	
Копіювати		Формат А1	

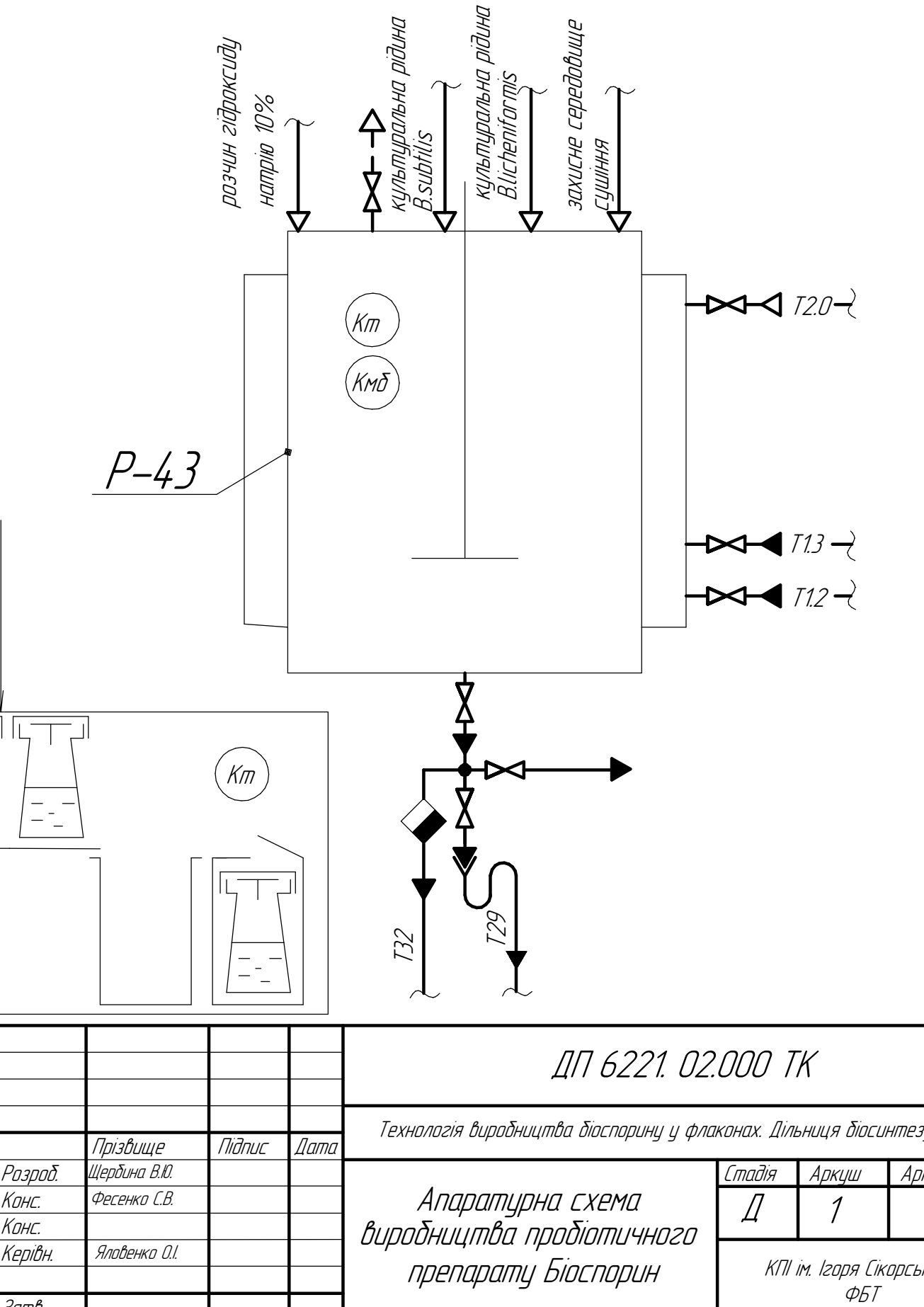


Таблиця трубопроводів

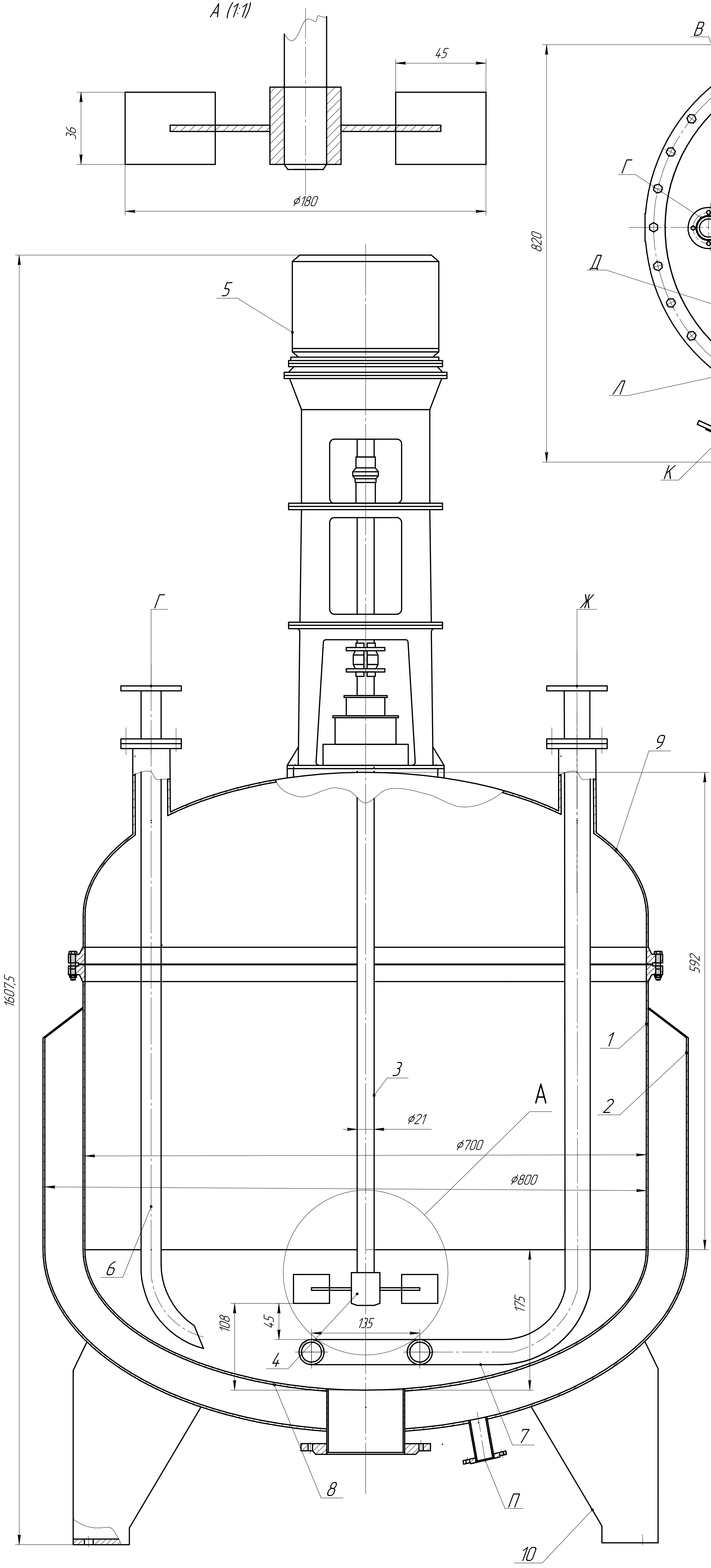
Умовне позначення		Найменування середовища в трубопроводі
Літерне	Графічне	
T10		Вода технічна гаряча
T11		Вода питна
T12		Вода технічна холодна
T13		Розчини дезінфікуючі
T20		Пара
T30		Повітря технологічне стерильне
T32		Повітря відпрацьоване
T29		Відходи рідкі (Води стічні)
T30		Відпрацьований холодоагент
T32		Конденсат

Таблиця апаратів

Поз.	Найменування	Кільк.	Примітка
Пр	Пробірка	6	
К	Колба	6	
Т	Термостат	1	
Пф	Посівний ферментер	2	
Д	Об'ємно-ваговий дозатор	6	
Фв	Виробничий ферментер	2	
Р	Реактор-змішувач	4	
Н	Насос відцентровий	1	
С	Ліофільна сушарка	1	
Х	Холодильник	1	
Ар	Апарат розливу	1	
За	Закупорювальний апарат	1	
Пм	Пакувальна машина	1	
Ф	Фільтр	5	
Зп	Повітряозабірник	1	
В	Вентилятор	2	
Нк	Нагрівальна колонка	1	
То	Теплообмінник	2	
Рс	Ресивер	1	



ДП 6221. 02.000 ТК				Технологія виробництва біоспирину у флаконах. Діляниця біосинтезу		
Розроб.	Проект.	Підпис.	Дата.	Апаратурна схема виробництва протитичного препарату Біоспирин	Станд.	Аркш.
Конс.	Щербина В.О.				Д	1
Конс.	Фесенко С.В.					
Керісн.	Яковенко О.І.				КП ім. Ігоря Сікорського ФБТ	
Затв.						



Позначення	Найменування	Кіл.	Øк
Б	Для поживного середовища	1	20
В	Для посівного матеріалу	1	20
Г	Для труби передавлювання	1	20
Д	Для вимірювання температури	1	25
Е	Для відведення повітря	1	25
Ж	Для подачі повітря	1	50
К	Для вимірювання рН	1	25
Л	Для дезінфікуючих розчинів	1	25
М	Оглядове вікно	1	70
Н	Для відбору проб	1	20
О	Вхід теплоносія	1	25
П	Вихід теплоносія	1	25

Поз.	Найменування	Кіл.	Найменування і марка матеріалу
1	Обчайка	1	12X18H10T ГОСТ 5632-72
2	Сарочка	1	Сталь 10 ДСТУ 2651:2005
3	Вал мішалки	1	12X18H10T ГОСТ 5632-72
4	Мішалка	1	12X18H10T ГОСТ 5632-72
5	Привід мішалки	1	12X18H10T ГОСТ 5632-72
6	Труба передавлювання	1	12X18H10T ГОСТ 5632-72
7	Барботер	1	12X18H10T ГОСТ 5632-72
8	Еліптичне днище	1	12X18H10T ГОСТ 5632-72
9	Кришка	1	12X18H10T ГОСТ 5632-72
10	Опора	1	12X18H10T ГОСТ 5632-72

Технічна характеристика

1. Апарат призначений для культивування бактерій *B.subtilis* 3/Re.

2. Номинальний об'єм, м³ 0,25

3. Коефіцієнт заповнення 0,5

4. Площа поверхні теплообміну рубашки, м² 0,052

5. Робочий тиск, МПа:

в апараті 0,13

в сарочці 0,3

6. Температура середовища в апараті, °C 37

7. Тип перемішуючого пристрою мішалка турбінна відкрита

кількість мішалок 1

частота обертання валу мішалки, с⁻¹ 5,2

потужність приводу, кВт 1

8. Габаритні розміри, мм

довжина: 820

ширина: 800

висота: 1607,5

9. Маса, кг 440

Технічні вимоги

1. Середовище в апараті не корозійне і не вибухонебезпечне.

2. Апарат повинен відповідати "Правилам встановлення і безпечної експлуатації апаратів, що працюють під тиском".

3. Провести гідравлічні випробування апарату на міцність пробним тиском 0,6 МПа.

4. Зварні шви контролювати рентгенопросвічуванням або УЗД.

5. Призначення штуцерів – див. таблицю штуцерів.

6. Граничні відхилення на виліт штуцерів 5мм.